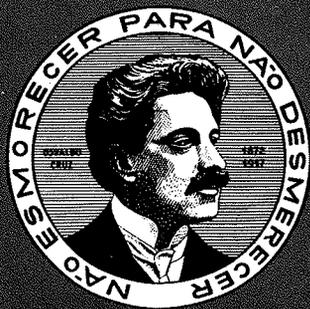


Vol. 3, nº 4, p. 169 - 200
1972

REVISTA
DE
MICROBIOLOGIA



Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

B-D **Mérieux** Reativos para Laboratórios

REATIVOS PARA BIOQUÍMICA

Amilase-Kit — Urea-Kit
Fosfatases ácidas e alcalinas
Reativos para Transaminases
Desidrogenases lácticas
Gluco-Kit — Uricacid-Kit
Amônia-Kit — Clor-Kit

REATIVOS PARA COAGULAÇÃO

Tromboplastina cálcica
Plasma normal testemunha

SOROS DE CONTRÔLE

Hemo-Trol — Icto-Trol
Lyo-Trol — Zimo-Trol
Mono-Trol — Stea-Trol

REATIVOS PARA SOROLOGIA

Prova do latex em lâmina
Prova do latex em tubo
Estreptolisina "O"
Sôro anti-proteína C
Antígeno brucélico
Complemento sêco
Sôro diagnóstico da rubéola
Mononucleose — Kit

Imunofluorescência

Isotiocianato de fluoresceína
Globulina anti-humana marcada
Suspensão *Treponema pallidum*
Antígeno Toxoplásmico com
testemunho positivo
Tampão P.B.S.



Baltimore Biological Laboratory

MEIOS DE CULTURA DESIDRATADOS REAGENTES

ANTÍGENOS — SOROS

PEPTONAS E INGREDIENTES — DIVERSOS

APARELHOS CIENTÍFICOS

JARRA PARA ANAERÓBIOS GASPAK

BIOLAB

PRODUTOS BIOLÓGICOS PARA LABORATÓRIOS LTDA.

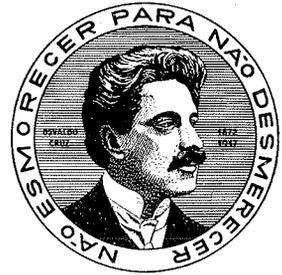
Rio de Janeiro — GB: Rua Rezende, 96 A — Tel.: 221-4651 — 221-4089

São Paulo: Av. Cásper Líbero, 58 — Sala 1603 — Tel.: 35-2691

DISTRIBUIDORES EXCLUSIVOS

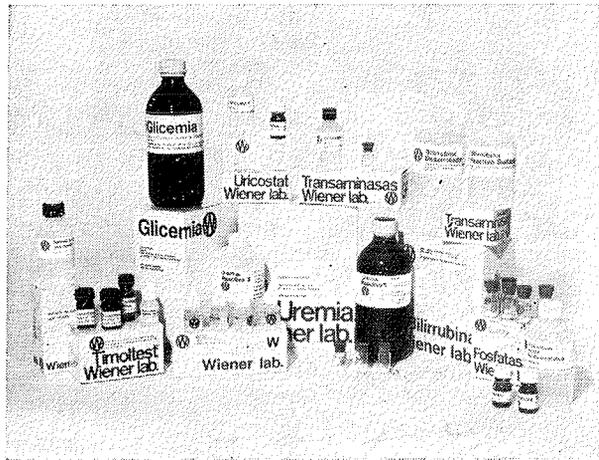
REVISTA
DE
MICROBIOLOGIA

REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cid. Universitária - USP
05508-900 — São Paulo/SP



-
- Revista de Microbiologia** Publicação trimestral da Sociedade Brasileira de Microbiologia
- Conselho Editorial** Luiz R. Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo
- Editor** João Salvador Furtado
- Editores Associados** Antônio F. Pestana de Castro e Sílvio A.C. Camba
- Comitê Redatorial** Adam Drozdowicz, Adhemar Purchio, Carlos A. Santa-Rosa, Elfried Kirchner, Erney P. de Camargo, Flávio Alterthum, Ivone R. Suassuna, João Lúcio de Azevedo, Johanna Döbereiner, José A. Serrano, Laerte M. de Andrade Léa Camillo-Coura, Luiz R. Travassos, Marcelo Magalhães, Maria Elisa Z. Maluf, Newton N. da Silva, Octávio A. de C. Pereira, Olga F. Gompertz, Paulo S. Minami, Tomoko Higuchi, Walter Borzani, Wladimir Lobato Paraense, Zéa C. Lins
- Conselho Científico** Amadeu Cury, Augusto E. Taunay, A. Monteiro Filho, Carlos da Silva Lacaz, Ciro A. Peluffo, Dácio de A. Christóvão, Dirce Franco de Araujo, Eduardo O. Cisalpino, Gobert de A. Costa, Homero S. Jobin, Jandira Planet do Amaral, João Xavier Viana, José Noronha Peres, José Oliveira de Almeida, Lúcio P. de Carvalho Lima, Luiz Siqueira Carneiro, Milton Fontes Magarão, Oswaldo G. de Lima, Otávio Barachini, Otto G. Bier, Paulo de Góes, Raymundo A. C. Moniz de Aragão, Seymor H. Hutner, Werner K. Maas
- Correspondência geral** João S. Furtado
Instituto de Botânica
Caixa Posta 4005
01000 São Paulo SP Brasil
- Aquisição por não-membros** Cada exemplar Cr\$ 15,00; número atrasado Cr\$ 20,00; assinatura anual para o Brasil Cr\$ 60,00 e para o exterior US\$ 10,00 (via marítima) ou US\$ 15,00 (via aérea). Cheques em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia.
- Subscription by non-members** Single copy US\$ 2.50; back number US\$ 3.50; annual subscription US\$ 10.00 (surface mail) or US\$ 15.00 (air mail); check or money order payable to Sociedade Brasileira de Microbiologia, sent to the Editor.

exatamente
a solução
procurada...



KITS PARA BIOQUIMICA WIENER

- excepcional estabilidade dos reativos
aproveitamento integral
- simplicidade operacional
grande economia de tempo
- especificidade
segurança nos resultados
- macro-microtécnicas
vantagem adicional

GARANTIA TOTAL



— solicite folhetos e listas de preços —

Revista de Microbiologia

Órgão oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 3 Outubro-Dezembro 1972 Número 4

Rev. Microbiol. 3(4)

CONTEÚDO – CONTENTS

Artigos originais

- T-strain of *Mycoplasma* in abacterial urethritis – Marcelo Magalhães, Adelma Vêras & Luiz Numeriano. . . . 169
- Análise microbiológica de colina em cafés brasileiros [*Microbiological assay for choline in Brazilian coffee*].
– Elma N. Suassuna de Oliveira, Betinha Campos & E.B. de Oliveira. 173
- Anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em soros de doadores de Sangue no Recife, detectados por imuno-
fluorescência [*Antibodies against Toxoplasma gondii in sera of blood bank donors in Recife, detected
by indirect immunofluorescence technique*] – Diva Montenegro, Vital Lira & Ester Azoubel 177
- Colonização de doentes hospitalizados por *Staphylococcus aureus* e bactérias gram-negativas [*Colonization
of hospitalized patients by Staphylococcus aureus and gram-negative bacteria*] – Rudolf Uri Hutzler,
Luiz Rachid Trabulsi & Guilherme Rodrigues da Silva. 179

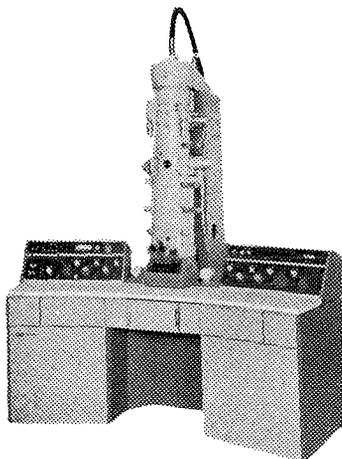
Revisão

- Transcrição gênica em bactérias [*Gene transcription in bacteria*] – Walter Colli 191

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
Depto. de Microbiologia – ICB II – USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – Cid. Universitária
CEP 05508-900 – São Paulo - SP - BRASIL
Site: www.revmicro.cjb.net

JEOL

**GARANTE A ASSISTÊNCIA TÉCNICA E A
CAPACIDADE DE TODOS OS
SEUS EQUIPAMENTOS**

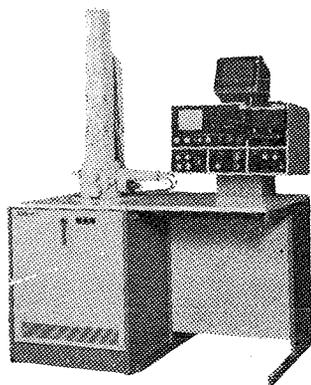
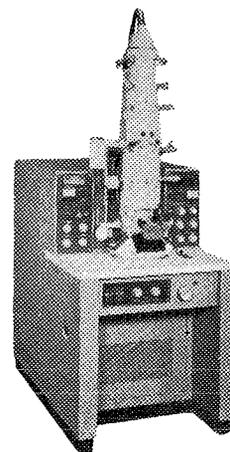


Microscópio Eletrônico JEM-100B

- De resolução garantida de 2Å (máxima do mundo)
- Goniômetro Universal de resolução garantida de 3,4Å
- Tensão de aceleração : 20 — 40 — 60 — 80 — 100kV
- Ampliação direta : x300 ~ x500.000
- Acessório Scanning de resolução garantida de 100Å

Microscópio Eletrônico JEM-T8

- De resolução garantida de 6.9Å
- Tensão de aceleração: 60kV
- Ampliação direta : x500 ~ x100.000
- Sistema de controle do vácuo automático
- Com dispositivo automático de exposição para fotografar



Microscópio de Varredura JSM-S1

- De resolução garantida de 250Å
- Ampliação : x19 ~ x100.000
- Com estrado de Goniômetro
- Com acessório TV scanning
- Controle do vácuo automático e máquina fotográfica automática

JEOL LTD., Tokyo, Japan

JEOL DO BRASIL - Assistência Técnica

Rua da Glória, 654 — N.º 16 — São Paulo

Tel.: 279-1032

Instruções aos autores

A Revista de Microbiologia publica trabalhos originais em todos os campos da microbiologia e da protozoologia. Revisões e atualizações serão publicadas a convite do conselho editorial.

Os manuscritos devem ser enviados em duplicata (original e uma cópia) para o Editor da Revista.

NORMAS GERAIS — Todo manuscrito submetido à Revista deve representar pesquisa original inédita e que não será publicada em outro órgão. Os trabalhos podem ser redigidos em português, espanhol ou inglês. Se aceitos pela Revista, não poderão ser reproduzidos, mesmo em partes, sem permissão oficial dos Editores.

A Revista segue, essencialmente, o "Style Manual for Biological Journals" (2ª edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (*Genetics*, 54: 61, 1966). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras da IUPAC-IUB (*J. Biol. Chem.*, 241: 527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nano (n) e pico (p), ao invés de milimicro (m μ) e micromico ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μ m; 10^{-6} m), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm; 10^{-9} m), ao invés de milimicro (m μ); e Angstroms (A; 10^{-10} m). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microgramas por mililitros (μ g/ml) ou microlitros por litro (μ litros/litro). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA DE MICRORGANISMOS — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (7ª ed., 1957) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Bergey deverá ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo. Quando um nome novo for proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

FORMA DO MANUSCRITO — Os trabalhos devem ser datilografados em papel branco, comum, tamanho ofício, em espaço duplo ou triplo, deixando-se o mínimo de 3 cm de margens laterais, superior e inferior. Títulos de capítulos de primeira ordem devem ser centrados, incluídos essencialmente pela ordem: **Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências Bibliográficas**. Os de subcapítulos devem ser junto à margem esquerda. A *página-título* deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, centrado usando-se letras maiúsculas somente quando obrigatórias, (ii) o(s) nome(s) do(s) autor(es) com maiúsculas e minúsculas normalmente usadas e (iii) afiliação como nota de rodapé, indicada por asterisco.

O *resumo* não deverá ultrapassar 250 palavras. Os trabalhos redigidos em inglês devem ser acompanhados de um título e resumo em português; os redigidos em português e espanhol, de um título e resumo em inglês. O resumo na língua do trabalho e o título com resumo na outra língua devem ser datilografados em página separada do restante do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — No texto, as referências devem ser citadas por número. Os sobrenomes de dois autores devem ser separados por &; quando houver mais de dois autores, a separação é feita por ponto e vírgula e o último por &. Na seção **Referências Bibliográficas**, as citações devem ser por ordem alfabética de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas sequencialmente. Os artigos em periódicos devem ser citados na seguinte ordem: nome(s) do(s) autor(es) em maiúsculas, título do trabalho, nome do periódico (abreviado de acordo com o World Medical Periodicals), número do volume, número do fascículo (quando desejado; colocado entre parênteses), número da primeira e da última página do artigo, e ano da publicação.

Exemplo:

WEISER, O.L. & EMERSON, J.S. — Selective screening for quantitative urine cultures.
Amer. J. clin. Path., 45:649-650, 1966.

Quando puder ocorrer confusão com o título do periódico, o local da publicação deverá ser mencionado entre parênteses, após a abreviação. Exemplo: *Publ. Hlth Rep. (Wash.)*.

Citações de livros devem ter a seguinte ordem: autor(es), título, edição, local, editores e data. Exemplo:

MILLER, S.E. — A textbook of clinical pathology. 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1960.

Citações de "resumos", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionadas no texto, mas não serão aceitas como referências bibliográficas.

TABELAS — Devem ser numeradas em arábico e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na seção correspondente.

ILUSTRAÇÕES — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no dobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com retícula devem ser feitas em papel brilhante, com contraste adequado para reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob TABELAS. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

NOTAS BREVES — Não devem exceder a 500 palavras e o respectivo resumo não mais do que 25. O(s) autor(es) deve(m) consultar um número da Revista para familiarização com a forma e o estilo.

SEPARATAS — Serão fornecidas, gratuitamente, 10 separatas por artigo. Para encomendas maiores, o(s) autor(es) deve(m) entrar em entendimento com o Editor, correndo as despesas por conta dos interessados.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Sócios Patrocinadores

BIOLAB – Produtos Biológicos para Laboratórios Ltda.

B. Herzog – Comércio e Indústria S.A.

CELM – Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos

Eli Lilly do Brasil Ltda.

Indústrias Farmacêuticas Fontoura Wyeth S.A.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

Laboratório Roche – Produtos Químicos e Farmacêuticos

Pfizer Química Ltda.

T-Strain of *Mycoplasma* in abacterial urethritis

Marcelo Magalhães*, Adema Vêras* & Luis Numeriano**

Summary

Out of 80 males with abacterial urethritis and 84 with gonorrhoea, T-strain mycoplasmas were recovered in 62.5 and 26.2% respectively. These highly significant values ($p > 0.001$) suggest that T-*Mycoplasma* is one of the major etiologic agent of nongonococcal urethritis.

Resumo

Mycoplasma linhagem T em uretrite abacteriana

Entre 80 pacientes masculinos portadores de uretrites não bacterianas e 84 portadores de gonorréia, foram isoladas amostras de micoplasmas T nas proporções de 62,5 e 26,2%, respectivamente. Estes números são altamente significantes ($p > 0,001$) e apontam *Mycoplasma* T como um dos principais agentes etiológicos de uretrites não gonocócicas.

Introduction

Although twenty years have been elapsed since the pioneer reports of Shepard^{10,11} connecting T-strain mycoplasmas with abacterial urethritis in male, there is still a disagreement regarding the etiologic significance of that microorganism in human pathology. Shepard¹³ and some authors^{2,3} believe that 60 to 93% of patients with nongonococcal urethritis (NGU) have their disease associated with T-*Mycoplasma*. In contrast, others^{5,9} have questioned that view mainly because the isolation rate of T-mycoplasmas was closely the same observed in NGU and either in healthy or gonococcal control groups.

The purpose of this work is to offer additional information to the problem.

Material and Methods

Selection of urethritis patients — The study group was represented by 80 patients who fulfilled the following criteria: a) purulent or non-purulent urethral discharge, observable from physical examination; b) recent disease, less than 30 days; c) absence of treatment with broad spectrum antibiotics; d) negative cultures for recognized urethral pathogens or microorganisms of dubious pathogenicity, such as: *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, *Trichomonas vaginalis*, *Haemophilus vaginalis*, *H. influenzae*, *Streptococcus haemolyticus*, *Str. faecalis*, *Acinetobacter anitratum*, *A. Iwoffii*, *Mycoplasma hominis*, *Candida albicans* and Enterobacteriaceae.

As a control group, 84 gonococcal patients were also included; both groups were studied concurrently.

* Disciplina de Microbiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

** Clínica Urológica, Hospital Universitário, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Bacteriological methods — Urethral discharges were collected with a nichrom loop and placed in 0.2 ml of sterile Brain heart infusion (Difco). *T. vaginalis* was excluded by CPLM medium¹ and the other microorganisms by carrying out standard culture procedures as described elsewhere⁸.

For isolation of T-strains, pathological specimens were plated on A-6 differential agar medium¹⁴. The environment of reduced oxygen and adequate level of carbon dioxide were provided by using a modified Fortner method¹². After 24 or 48 h at 37°C culture plates were examined under low power objective (100 X) of the microscope.

Results

The frequency of T-*Mycoplasma* isolations in both groups of urethritis patients is presented in Table 1. Out of 80 patients with abacterial urethritis, T-strains were recovered from 50 cases (62.5%). On the other hand, the rate of isolation among 84 gonorrhoea controls was 22 (26.2%).

Table 1

T-*Mycoplasma* associated with nongonococcal and gonococcal urethritis

GROUP	Total examined	Positive		Negative	
		Nº	%	Nº	%
NGU	80	50	62.5	30	37.5
GCU	84	22	26.2	62	73.8

A statistical comparison by Chi square analysis of T-strains *Mycoplasma* isolations in abacterial and gonococcal groups yielded highly significant values ($p > 0.001$).

The morphology of T-strain colonies in A-6 medium is sufficiently characteristic to permit immediate diagnostic. The colonies are minute (15-60 μm), dark golden-brown, contrasting to the typical fried-egg appearance of large classical mycoplasmas (Figs. 1 and 2).

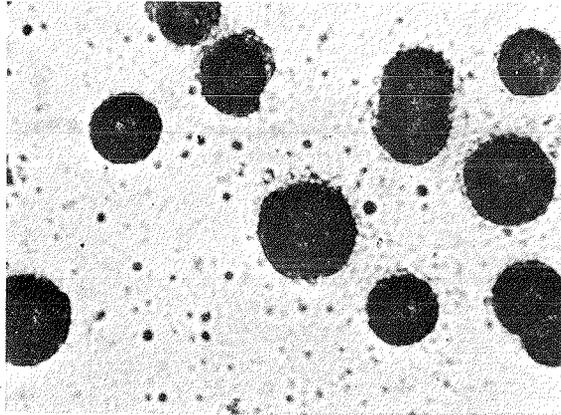


Fig. 1 — T-*Mycoplasma* colonies from a urethral discharge in abacterial urethritis (180 X).

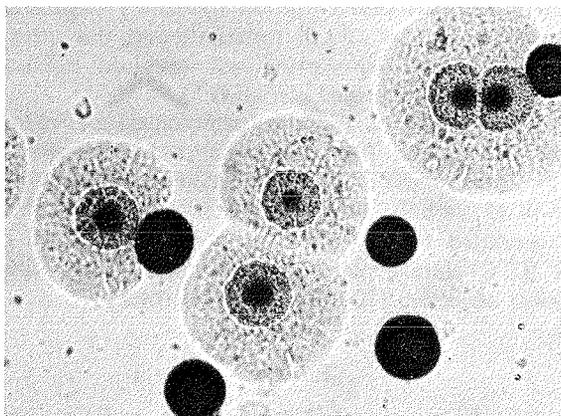


Fig. 2 — Mixture of T-strain and *M.hominis* colonies on differential agar medium (100 X).

Discussion

The present findings support strongly the views^{2,3,13} connecting T-*Mycoplasma* with the etiology of abacterial urethritis. Nevertheless, since the microorganism has been recovered from a reasonable number of regular or gonococcal individuals, its pathogenic role has been questioned^{5,9}. This, however, is not surprising in host-parasite relationships where overt disease is not the commonplace but rather the exception.

Indeed, there are some obscure aspects in the association between T-strains and abacterial urethritis. Concerning this, one of the most interesting puzzles is the high incidence of T-mycoplasmas

in the vagina of married women without transmission of the infection to their partners. Probably, the development of local secretory antibody in the urethra of such husbands may explain their resistance to infection by the carrier strain in the wife. Since several serotypes of T-strains have been found⁷, exposure to a different serotype in another woman might establish a T-urethritis.

Additional problem, in the understanding of the etiopathogenic significance of T-strains, has come with the treatment of abacterial urethritis using tetracycline. Lassus & col.⁶ employed doxycycline in the treatment of NGU patients both positive and negative for T-mycoplasmas. In both groups an equal incidence of cures was obtained. Since tetracycline is also effective in chlamydial infections it is difficult to decide whether a negative T-strain NGU, successfully treated, was connected to chlamydia or to a T-mycoplasma missed because the primary culture system was unsuitable. Recently⁴, chlamydia were only isolated from 8% of cases and this would not support the opinion that chlamydia are a common agent in NGU.

Undoubtedly, in Recife, PE, Brazil, T-*Mycoplasma* is the major etiologic agent of abacterial urethritis. However, we are considering the possibility that other microorganisms, chlamydia and viruses included might explain the negative cultures in almost 40% of our urethritis patients.

References

1. CARNERI, I.; EMANUELI, A. & SIGNORELLI, I. Efficiency of microscopic examination of fresh smears and cultures in diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 100:299-301, 1968.
2. CSONKA, G.W.; WILLIAMS, R.E. & CORSE, J. T-strain *Mycoplasma* in non-gonococcal urethritis. *Lancet*, 1:1292-1295, 1966.
3. FORD, D.K.; RASMUSSEN, G. & MINKEN, J. T-strain pleuropneumonia-like organisms as one cause of non-gonococcal urethritis. *Brit. J. Vener. Dis.*, 38:22-25, 1962.
4. FORD, D.K. - T-strain mycoplasmas and genital *Chlamydiae*: Inhibition of T-strain urease by hydroxamic acids. *J. Infect. Dis.*, 127:S82-S83, 1973.
5. HAAS, H.; DORFMAN, M.L. & SACHS, T.G. - T-strains of *Mycoplasma* and non-gonococcal urethritis, *Brit. J. Vener. Dis.*, 47:131-134, 1971.
6. LASSUS, A.; PERKO, R.L.; STUBB, S.; MATTILA, R. & JANSSON, E. - Doxycycline treatment of nongonococcal urethritis with special reference to T-strain mycoplasmas. *Brit. J. Vener. Dis.*, 47:126-130, 1971.
7. LIN, J-S.L.; KENDRICK, M.I. & KASS, E.H. - Serological typing of human genital T-mycoplasmas by a complement-dependent mycoplasmacidal test. *J. Infect. Dis.*, 126:658-663, 1972.
8. MAGALHÃES, M. & VÊRAS, A. - Frequência e identificação do *Haemophilus vaginalis* isolado de vaginites. *Rev. Microbiol.*, 2:73-77, 1971.
9. OSOBA, A.O. - *Mycoplasma* in the genito-urinary tract of nigerians. *Afr. J. Med. Sci.*, 3:187-194, 1972.
10. SHEPARD, M.C. - The recovery of pleuropneumonia-like organisms from Negro men with and without nongonococcal urethritis. *Amer. J. Syph. Gonorr. Vener. Dis.*, 38:113-124, 1954.

11. SHEPARD, M.C. - T-form colonies of pleuropneumonia-like organisms. *J.Bact.*, 71:362-369, 1956.
12. SHEPARD, M.C. - Cultivation and properties of T-strains of *Mycoplasma* associated with nongonococcal urethritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 143:505-514, 1967.
13. SHEPARD, M.C. - Nongonococcal urethritis associated with human strains of "T" mycoplasmas. *J.A.M.A.*, 211:1335-1340, 1970.
14. SHEPARD, M.C. & LUNCEFORD, C.D. - Differential agar medium for identification of "T" mycoplasmas in primary cultures. *Bacteriol. Proc.*, 70:83, 1970.

11/15/1911

Análise microbiológica de colina em cafés brasileiros

Elma N. Suassuna de Oliveira*, Betinha Campos** & E.B. de Oliveira ***

Resumo

Quinze variedades de cafés brasileiros foram dosadas, microbiologicamente, para averiguação do teor de colina total, livre e combinada. As dosagens foram efetuadas na semente propriamente dita e no material comumente chamado de casca e polpa, constituído pelo epicarpo, mesocarpo e endocarpo do fruto, usando-se o fungo *Torulopsis pintoopesii* como indicador. Os resultados foram analisados estatisticamente, com a média de 847,08 $\mu\text{g/g}$ de colina total nas sementes e 471,75 $\mu\text{g/g}$ na casca e polpa.

Summary

Microbiological assay for choline in Brazilian coffee

Microbiological assays for choline (total, free and combined) were made in fifteen varieties of Brazilian coffee from experimental field station. Seed or endosperm, rind and pulp, which compose the epicarp, mesocarp and endocarp of the fruit, were assayed. The fungus *Torulopsis pintoopesii* was used as the indicator organism. Results were statistically evaluated, with an average of 847.08 $\mu\text{g/g}$ of total choline, in the seeds and 471.74 $\mu\text{g/g}$ in the rind and pulp.

Introdução

Embora não possa ser considerada como vitamina "sensu stricto", a inclusão de colina como fator essencial na dieta diária foi definitivamente estabelecida com os trabalhos pioneiros do grupo de Best, quando comprovaram, experimentalmente, que a função hipotrófica da lecitina⁵ era devida primordialmente à colina^{4,6,8}. Os trabalhos que se seguiram, vieram apenas reforçar a importância fisiológica da colina como agente lipotrófico^{1,3,9,12,13,19,21,22}.

Paralelamente aos estudos de Best, no campo da fisiologia, o grupo de Du Vigneaud desenvolveu os primeiros passos, assegurando, à colina, lugar bioquimicamente importante no metabolismo, caracterizado pela capacidade de armazenar e ceder radicais metila^{14-17,19,23}.

A ocorrência de colina em alimentos não tem sido convenientemente explorada¹⁸ e, em se tratando especificamente de café, a literatura especializada mostra-se bastante limitada, com apenas dois trabalhos encontrados^{24,25}, e nos quais não constam dados relativos a café brasileiro. O primeiro, registra a presença de vitaminas no café instantâneo, enquanto o segundo faz a avaliação do café verde e torrado, sob o ponto de vista nutritivo, especificamente vitaminológico.

No presente trabalho, efetuamos a análise microbiológica da colina em quinze variedades de cafés brasileiros, considerando sua importância bio-

química e fisiológica, buscando contribuir para o conhecimento do valor alimentício de um dos produtos de maior consumo e importância econômica para o Brasil.

Material e Métodos

Amostras de café de diversas variedades como San Bernardo, Laurina, Sumatra, Mundo Novo (linhagens Cp-379-19 e Cp-376-A), Bourbon Vermelho e Bourbon Amarelo de Jaú, San Ramón, Amarelo de Botucatu, Cera, Caturra Amarelo e Caturra Vermelho, Murta, Nacional e Purpuracens, fornecidas pela Estação Experimental de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, do Instituto Brasileiro do Café, foram usadas para as dosagens.

A colina foi dosada microbiologicamente, utilizando-se como indicador a amostra de *Torulopsis pintoopesii* nº 2616, segundo o método introduzido por Cury & col.¹¹. Paralelamente à dosagem da semente do café, constituída pelo endocarpo do fruto, foram feitas dosagens também na casca e polpa, material que engloba o epicarpo, mesocarpo e endocarpo ou pergaminho. Antes de ser submetido ao tratamento adequado à preparação dos extratos, o material foi previamente secado em estufa a 37°C, sendo, a seguir, triturado em moinho "Willey", a fim de serem obtidas partículas no menor diâmetro possível. Além da determinação de colina livre, em solução aquosa, foram obtidos hidrolizados des-

* Instituto de Biologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

** Escola de Florestas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

*** Escola de Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

tinados à verificação do teor de colina total, conforme recomenda o método adotado¹¹, obtendo-se, pela diferença, o teor correspondente à colina presente sob a forma combinada. Os extratos foram submetidos à passagem em coluna de permutita (segundo Folin) e eluídos com solução de cloreto de sódio a 5%, para eliminar a interferência da metionina nos resultados.

Cada resultado exposto por variedade de café corresponde a um mínimo de três dosagens concordantes, sendo as médias finais obtidas a partir de cinco alíquotas em cada dosagem.

Os resultados estão expressos em micrograma de colina por grama de café maduro, seco e não torrado. Foi usada a designação de "semente" para o endocarpo do fruto, e "casca e polpa" para o conjunto formado pelo epicarpo, mesocarpo e endocarpo.

Resultados

Os resultados obtidos para colina total, livre e combinada, tanto na semente como na casca e polpa do fruto do café, estão incluídos na Tabela 1.

Colina total — A colina total na semente oscila entre 511,42 e 1.352,80 μg de colina nas variedades Nacional e Murta, respectivamente. Os teores encontrados na casca e polpa variaram entre 193,49 μg , na variedade Caturra Vermelho e 796,70 μg , na variedade Purpuracens.

Colina livre — Os teores mínimo e máximo de colina livre encontrados na semente foram de 298,33 μg na variedade San Ramón e de 696,16 μg na variedade Murta. Na casca e polpa, registrou-se um teor mínimo de 88,08 μg na variedade Bourbon Amarelo de Jaú, alcançando o máximo de 334,31 μg na variedade Mundo Novo, linhagem Cp-379-19.

Colina combinada — O valor quantitativo de colina combinada, obtida pela diferença entre os teores de colina total e livre, demonstra que, na semente, o teor mínimo de 39,56 μg situa-se na variedade Caturra Vermelho, enquanto que o máximo, 736,28 μg , é encontrado na variedade Purpuracens. O valor mínimo (20,53 μg), encontrado na casca e polpa, foi registrado na variedade Mundo Novo (linhagem Cp-376-A), enquanto que o máximo foi observado na variedade Purpuracens, na concentração de 591,66 μg .

A análise da variância, baseada nos dados expressos em micrograma de colina por grama de café, está representada na Tabela 2, na qual se verifica um efeito significativo, ao nível de 1% de probabilidade, para variedades e localização, nada se constatando para formas, embora estas interajam com variedades e localização e estas não o façam entre si.

As diferenças mínimas significativas foram calculadas pelo método de Tuckey:

Variedades	Δ	=	288,28
Localização	Δ	=	77,42
Formas	Δ	=	55,72

Discussão

Pela análise estatística dos dados, conclui-se que as variedades Purpuracens, Cera e Murta diferem apenas das variedades Mundo Novo (linhagem Cp-376-A) e Caturra Vermelho, enquanto as demais não diferem entre si quanto aos teores de colina ao nível de 5%.

A análise da variância demonstra ainda que, em relação à localização, os teores de colina diferem significativamente ao nível de 1%. Além disso, as formas de colina não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Em trabalhos anteriores, versando sobre vitaminas no café, especificamente ácido nicotínico^{10,20}, foi aventada a hipótese de que o teor vitamínico estaria mais intimamente relacionado à variedade propriamente dita, do que a condições exógenas de cultivo. Uma vez que as amostras em estudo são originárias de cafeeiros experimentalmente controlados, permitindo o máximo de homogeneidade nas condições de cultivo, acreditamos que os resultados obtidos venham reforçar essa afirmação.

Os resultados estão em concordância com os de Tepy & Prier²⁵, que obtiveram valores correspondentes a 590 μg de colina por grama de café verde.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Luiz José Bove Kesilowski, pela colaboração na análise estatística dos dados, e à Sra. Roseli Aparecida Rocha Franco, pela assistência técnica.

Referências Bibliográficas

- ARTOM, C. & CORNATZER, W.E. - Action of choline and fat on the formation of phospholipids in the intestine. *J. Biol. Chem.*, 165: 393-394, 1946.
- ARTOM, C. & CORNATZER, W.E. - The action of choline and fat on lipid phosphorylation in the liver. *J. Biol. Chem.*, 171: 779-789, 1947.
- BENTON, D.A.; HARPER, A.E. & ELVEHJEM, C.A. - The effect of different fats on liver fat deposition. *J. Biol. Chem.*, 218: 693-700, 1956.
- BEST, C.H.; FERGUSON, G.C. & HERSHEY, J.M. - Choline and liver fat in diabetic dogs. *J. Physiol.*, 79: 94-102, 1933.
- BEST, C.H.; HERSHEY, J.M. & HUNTSMAN, M.E. - The effect of lecithine on fat deposition in liver of normal rat. *J. Physiol.*, 75: 56-66, 1932.
- BEST, C.H. & HUNTSMAN, M.E. - The effects of the components of lecithine upon deposition of fat in the liver. *J. Physiol.*, 75: 405-412, 1932.
- BEST, C.H. & HUNTSMAN, M.E. - The effect of choline on the liver fat of rats in various states of nutrition. *J. Physiol.*, 83: 255-274, 1935.
- BEST, C.H. & RIDOUT, J.H. - Undernutrition and liver fat. *J. Physiol.*, 94: 47-66, 1938.
- BOXER, G.E. & STETTEN, Jr., D. - The effect of dietary choline upon the rats on turnover of phosphatide choline. *J. Biol. Chem.*, 153: 617-625, 1944.
- BRESSANI, R. & NAVARRETE, D.A. - Niacin content of coffee in Central América. *Food Research*, 24: 344-351, 1959.
- CURY, A.; OLIVEIRA, E.N.S.; TRAVASSOS, L.R.

Tabela 1
Teores de colina total, livre e combinada no café brasileiro

	Livre	Semente Combinada	Total (1)	Livre	Casca e Polpa Combinada	Total (2)	Total Geral (1+2)	U _i
San Bernardo	335,66	284,01	619,67	124,05	273,65	397,70	1.007,37	254,37
Laurina	458,37	355,21	813,58	112,32	388,50	500,82	1.304,40	328,60
Sumatra	563,98	303,86	867,84	241,27	317,96	559,23	1.427,07	336,77
Mundo Novo (Cp-379-19)	401,98	250,72	652,70	334,31	46,77	281,08	1.033,78	258,45
San Ramón	298,83	393,19	692,02	214,67	197,54	412,21	1.104,23	276,10
Bourbon Vermelho	513,77	359,41	873,18	151,40	483,83	635,23	1.508,41	377,10
Amarelo de Botucatu	480,73	545,75	1.026,48	184,36	233,60	417,97	1.444,45	361,11
Cera	636,21	638,15	1.274,36	230,14	477,52	707,66	1.982,02	495,50
Bourbon Amarelo de Jaú	447,65	296,07	743,72	88,08	293,61	381,69	1.125,41	281,35
Caturra Amarelo	580,53	368,29	948,82	197,28	519,86	707,14	1.665,96	416,49
Mundo Novo (Cp-376-A)	460,76	77,33	538,09	231,00	20,53	251,53	789,62	197,41
Murta	696,16	656,64	1.352,80	182,62	410,85	593,47	1.946,27	486,57
Nacional	455,40	56,02	511,42	157,28	83,14	240,42	751,84	287,96
Caturra Vermelho	531,32	39,56	570,88	135,35	58,14	193,49	764,37	191,10
Purpuracens	529,50	736,28	1.265,78	205,04	591,66	796,70	2.062,48	515,62
Totais	7.390,85	5.360,49	12.751,34	2.789,17	4.397,17	7.186,34	19.937,68	
Localização	12.751,34				7.186,34			
Formas			10.180,02				9.757,66	

Tabela 2

Análise da variância dos dados obtidos para colina em 15 variedades de cafés brasileiros

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F
Variedades	14	683.357,35	48.811,27	4,80 ⁺⁺
Localização	1	516.153,75	516.153,75	50,80 ⁺⁺
Formas	1	2.973,13	2.973,13	0,29
Variedades x Localização	14	89.276,88	6.276,92	0,63
Variedades x Formas	14	417.533,73	29.823,84	2,94 ⁺
Localização x Formas	1	220.627,73	220.627,73	21,71 ⁺⁺
Resíduo	14	142.250,17	10.160,73	
Total	59			
F(14,14) 1% = 3,70		F(1,14) 1% = 8,86		F(14,14) 5% = 2,48

- & CRUZ, F.S. - A new microbiological method for choline assay. *An. Microbiol.*, 13: 11-24, 1965.
- DEUEL, Jr., H.J.; MURRAY, S.; HALLMAN, L.F. & TYLER, D.B. - Studies on ketosis. XII. The effect of choline on the ketonuria of fattening rats following a high fat diet. *J. Biol. Chem.*, 120: 277-288, 1937.
 - DILUZIO, N.R. & ZILVERSMIT, D.B. - The effect of choline on phospholipid synthesis in dog liver slices. *J. Biol. Chem.*, 205: 867-871, 1953.
 - DUVIGNEAUD, V.; CHANDLER, J.P.; MOYER, A.W. & KEPPEL, D.M. - The effect of choline on the ability of homocystine to replace methionine in the diet. *J. Biol. Chem.*, 131: 57-76, 1939.
 - DUVIGNEAUD, V.; COHN, M.; CHANDLER, J.P.; SCHENCK, J.R. & SIMMONS, S. - The utilization of the methyl group of methionine in the biological synthesis of choline and creatine. *J. Biol. Chem.*, 140: 625-641, 1941.
 - DUVIGNEAUD, V.; RACHELE, J.R. & WHITE, A.M. - A crucial test of transmethylation "in vivo" by intramolecular isotopic labeling. *J. Clin. Chem. Soc.*, 78: 5131-5132, 1956.
 - GRIFFITH, W.H. & MULFORD, D.J. - Choline metabolism. VI. Hemorrhagic degeneration and the labile methyl supply. *J. Amer. Chem. Soc.*, 63: 929-932, 1941.
 - GRIFFITH, W.H. & NIC. J.F. - Occurrence of choline
 - In SEBRELL Jr., W.H. & HARRIS, R.S. (Eds.) *The Vitamins*. Vol. III p. 2-155. Academic Press. New York. 1971.
 - MOYER, A.W. & DUVIGNEAUD, V. - The structural specificity of choline and betaine in transmethylation. *J. Biol. Chem.*, 143: 373-382, 1942.
 - OLIVEIRA, E.N.S.; KIZAWA, K. & CAMPOS, B. - Análise microbiológica de ácido nicotínico e trigonelina em cafés brasileiros. *Rev. Microbiol.*, 3: 61-67, 1972.
 - PERLMAN, I. & CHAIKOFF, I.C. - Radioactive phosphorus as an indicator of phospholipid metabolism. V. On the mechanism of the action of choline upon the liver of the fat-fed rat. *J. Biol. Chem.*, 127: 211-220, 1939.
 - ROSSI, C.R. & PITTONI, A. - The action of choline and phosphoryl-choline on liver oxidative processes. *Biochem. Biophys. Acta*, 50: 271-276, 1961.
 - SIMMONDS, S.; COHN, M.; CHANDLER, J.P. & DUVIGNEAUD, V. - The utilization of the methyl groups of choline in the biological synthesis of methionine. *J. Biol. Chem.*, 149: 519-525, 1943.
 - TEPLY, L.J. - Nutritional study of instant coffee powder. *Food Technol.*, 12: 485-486, 1958.
 - TEPLY, L.J. & PRIER, R.F. - Nutritional evaluation of coffee including niacin bioassay. *Agr. Food Chem.*, 5: 375-377, 1957.

Anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em soros de doadores de sangue no Recife, detectados por imunofluorescência

Diva Montenegro*, Vital Lira** & Ester Azoubel***

Resumo

Resultados preliminares por imunofluorescência indireta para *Toxoplasma gondii*, em soros de 202 doadores de sangue no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, revelaram que, em 73,4% dos casos, a reação foi positiva para anticorpos específicos, dos quais apenas 2,3% iguais ou acima de 1:1.000.

Summary

Antibodies against Toxoplasma gondii in sera of blood bank donor in Recife, detected by indirect immunofluorescence technique

Preliminary results of an investigation of antibodies against *Toxoplasma gondii* in blood bank donors from the hospital of Medical School, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil, were observed by indirect immunofluorescence technique. In 202 sera examined 73.4% gave positive reaction.

Introdução

O encontro muito frequente de anticorpos específicos contra *Toxoplasma gondii* na clínica particular, em Recife, sugeriu-nos averiguar o que estaria ocorrendo a este respeito em indivíduos aparentemente sãos. Por outro lado, a grande variação dos percentuais na literatura médica em diferentes países^{1,5-8} e mesmo no Brasil^{1,4,5,8,9,11} pareceu-nos reforçar a validade de uma investigação local sobre a magnitude de difusão deste parasita em nosso meio.

Os resultados constituem dados iniciais de um plano de estudo mais amplo de população e de outros aspectos epidemiológicos relacionados com esta infecção.

Material e Métodos

Durante dois meses, foram examinadas 202 amostras consecutivas de soros de doadores de sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

Ficha de inquérito — Em 160 dos doadores, foi possível obter todos ou a maior parte dos dados seguintes: idade, sexo e profissão; contacto com animais; dados indicativos ou sugestivos de infecção pregressa por *Toxoplasma gondii*.

Reação de imunofluorescência indireta (modificação de Camargo² à técnica de Goldman¹⁰)

a. *Antígeno* — Exsudato peritoneal de camundongos inoculados três dias antes com *Toxoplasma gondii* é centrifugado por 10 minutos a 200 rpm para

sedimentar os leucócitos. O sobrenadante removido é centrifugado a 2.000 rpm, durante 15 minutos, para sedimentar os toxoplasmas. Decanta-se o sobrenadante e ressuspendem-se os microrganismos em solução tamponada de fosfatos (PBS), pH7.2. Repete-se a lavagem por 3 ou 4 vezes. A suspensão final é distribuída em pequenas gotas sobre lâminas, segundo a técnica padronizada por Camargo³. Conservam-se os preparados a -20°C.

b. *Gama-globulina anti-humana marcada com isotiocianato de fluoresceína* — Foi observada a técnica usual de precipitação de globulinas de soros humanos pelo sulfato de amônio à meia saturação, em centrífuga refrigerada. Em seguida, para a obtenção do imune-soro desejado, foi utilizado o esquema modificado de Halborow & Johnson e as indicações de Rowe¹². O soro obtido foi fracionado por precipitação com sulfato de amônio em centrífuga refrigerada, seguido de diálise contra solução salina a frio. Calculado o teor proteico, realizou-se a conjugação, pelo método de adição rápida, da globulina com o isotiocianato de fluoresceína, obedecendo à relação F/P pré-estabelecida. O conjugado foi então passado em coluna de Sephadex G 50. Verificadas a especificidade e a diluição ótima de utilização, foi estocado em pequenas alíquotas a -20°C.

c. *Soro para exame* — Após inativação por 30 minutos em banho-maria a 56°C, os soros são diluídos sucessivamente ao quádruplo em tampão de fosfatos (PBS), pH7.2, 0,01 M, desde 1:16 a 1:4.096 e sucessivamente, quando necessário.

d. *Procedimento de reação* — Foi seguida a técnica

* Instituto de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

** Instituto de Cardiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

*** Banco de Sangue do Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

proposta por Camargo². Montadas sob glicerina tamponada, as preparações foram observadas ao microscópio de fluorescência Leitz Ortholux, com lâmpada U.V. HBO200, filtro primário BG 12 e barreira K 510.

Resultados

Todos os 202 doadores de sangue aparentavam normalidade física. De 160 fichas completas de inquérito, resultaram os seguintes dados:

Sexo — masculino	137
— feminino	23
Idades — De 10 a 19 anos:	23
— De 20 a 29 anos:	66
— De 30 a 39 anos:	39
— De 40 a 49 anos:	27
— De 50 a 59 anos:	5
Contactos com animais:	
Afirmativo	70 casos
Negativo	65 casos
Sem informação	25 casos
Profissões predominantes:	
Operário	61
Militares	21
Comerciários	19
Funcionários públicos	10
Motorista	10

A imunofluorescência, realizada nos 202 soros, forneceu os resultados constantes da Tabela 1, que permite inferir o percentual de positividade para anticorpos específicos contra *T. gondii* de 73,4% na amostra considerada.

Foi tentado estabelecer, em 150 casos, a relação entre os títulos obtidos à imunofluorescência indireta e a referência ao contacto com animais (Tabela 2), tendo-se mostrado difícil de analisar nas condições atuais de trabalho. Os outros ítems de inquérito foram abandonados, para os fins desta comunicação, por apresentarem imprecisões de formulação e impropriedade na aplicação.

Discussão

Apesar do caráter prévio desta comunicação, as seguintes considerações podem ser feitas: como não há dúvida acerca da fidelidade da reação de imunofluorescência indireta, é possível admitir, nesta etapa, percentual de difusão de *Toxoplasma gondii* consideravelmente alto em Recife. De qualquer modo, a cifra obtida na amostragem de 202 soros não pode ser considerada definitiva. Trabalho recente, realizado em Goiânia, Estado de Goiás, utilizando a reação de Sabin-Feldman e a intradermorreação, revelou 60,9% e 47% em dois bairros daquela cidade, respectivamente⁹. Dados como idade, sexo, profissão, referência a contacto com animais e os de indicação de acometimento pela infecção, indicam defeitos de representatividade, imprecisão e impropriedade de natureza e de aplicação do questionário, aspectos a serem levados em conta no prosseguimento do estudo.

Tabela 1

Anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em soros de 202 doadores de sangue na cidade de Recife.

Título	Nº casos	%
0	53	26,6
1:16	52	25,7
1:64	64	31,6
1:256	28	13,8
1:1.000	3	1,4
1:16.000	2	0,9
Total	202	100%

Tabela 2

Correlação entre títulos de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em soros de 160 doadores de sangue na cidade de Recife e contacto com animais.

Título	Nº casos	Contacto %
0	33	36,9
1:16	43	41,8
1:64	52	40,3
1:256	19	31,5
1:1.000	3	66,6

Referências Bibliográficas

- AMATO NETO, V. & CAMPOS, R. — Toxoplasmose. Liv. Atheneu S/A S. Paulo, 1970.
- CAMARGO, M.E. — Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 6: 117-118, 1964.
- CAMARGO, M.E. — Preparation of microscopical slides to simplify immuno-fluorescence serological titrations. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 7: 39-40, 1965.
- DEANE, L.M. — Inquérito de Toxoplasmose e Tripanosomíases realizado no território do Amapá pela IIIa. Bandeira Científica do Centro Acadêmico Oswaldo Cruz, da Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo. *Rev. Med. (S. Paulo)*, 47: 1-12, 1963.
- DELASCIO, D. — Toxoplasmose congênita (aspectos clínicos, obstétricos e experimentais). *Matern. e Inf. (S. Paulo)*, 15: 176, 1956.
- FELDMAN, H.A. — Toxoplasmosis — *New Eng. J. Med.*, 279: 1370-1375, 1968.
- FELDMAN, H.A. — Toxoplasmosis — *New Eng. J. Med.*, 279: 1431-1437, 1968.
- FELDMAN, H.A. & MILLER, L.T. — Serological study of toxoplasmosis prevalence. *Am. J. Hyg.*, 64: 320-335, 1956.
- FERNANDES, W.J.; BARBOSA, W.; CEVA, G.H.D. & OLIVEIRA, R.L. — Estudo preliminar sobre epidemiologia da toxoplasmose em Goiás. Investigação pela reação de Sabin-Feldman e toxoplasmina em dois bairros de Goiânia. *Rev. Pat. Trop.*, 1 (2): 267-276, 1972.
- GOLDMAN, M. — Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescent labelled antibody. *J. Exp. Med.*, 105: 549-556, 1957.
- NUSSENWEIG, R.S. — Toxoplasmose: inquérito sorológico feito pela prova do corante em doadores de sangue. *Hospital (R. Janeiro)*, 51: 723-728, 1957.
- ROWE, D.S. — Production of specific antisera. In HOLBOROW, E.J. (ed.) Standardization in immunofluorescence, Blackwell Scientific Pub., 1970.

Colonização de doentes hospitalizados por *Staphylococcus aureus* e bactérias gram-negativas

Rudolf Uri Hutzler*, Luiz Rachid Trabulsi** & Guilherme Rodrigues da Silva***

Resumo

Foram examinados 85 pacientes, internados em enfermaria de atividade médica não cirúrgica, durante 7 meses e com intervalo de 20 dias após os primeiros 5 meses. A amostra representou 5,1% do total de pacientes admitidos durante o período de estudo, cujo propósito foi o de verificar as variações de flora bacteriana nas áreas de nariz, garganta, nuca, umbigo e fezes. A coleta de material para cultura foi feita de modo a determinar a flora do paciente à sua entrada no hospital, uma primeira e uma segunda fase de internação. O aumento de portadores de *Staphylococcus aureus* no nariz, garganta, nuca e umbigo, na segunda fase de internação, ocorreu em pequena proporção. Gram-negativos aeróbios patogênicos, presentes no nariz, garganta, nuca e umbigo foram quase que exclusivamente representados por *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. e *Proteus* sp., havendo acentuado aumento dos portadores desses germes, nestas regiões, do período de entrada para a primeira fase de internação e desta para a segunda. Os mesmos organismos estiveram presentes nas fezes, com pequeno aumento no número de portadores de *Klebsiella* sp. e *Proteus* sp. Não ocorreu diferença para *P. mirabilis* e *Proteus* indol-positivos nas fezes, durante todas as fases do estudo.

Summary

Colonization of hospitalized patients by Staphylococcus aureus and gram-negative bacteria

Eighty five hospitalized patients from non-surgical infirmary were examined during 7 months, with an interval of 20 days after the first 5 months, representing 5.1% of the total number of patients admitted during the period, with the scope to determine the alteration of bacterial flora in nose, throat, nape, umbilicus and feces. Material was cultured at intervals to determine the bacteria present at patient's admission, a first and a second hospitalization phase. A small proportion of *Staphylococcus aureus* carriers in nose, throat, nape and umbilicus was noticed at the second hospitalization phase. Aerobic gram-negative pathogens present in those areas of the body were almost solely represented by *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. and *Proteus* sp., with a marked increase of carriers of such germs in those areas from hospital admission to the first hospitalization phase and from this to the second phase. The latter organisms were also present in the feces, with a slight increase of carriers for *Klebsiella* sp. and *Proteus* sp. No difference was noticed for *P. mirabilis* and *Proteus* indol-positive in feces during all hospitalization phases.

Introdução

Grande número de pacientes hospitalizados^{3,5,23,31,46} apresenta doença infecciosa associada às moléstias de base que motivaram suas internações. Segundo algumas publicações, este número varia de 10% a 25%. No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, observamos que, dos doentes que apresentam infecção nas enfermarias, aproximadamente 30% adquirem suas doenças infecciosas dentro do próprio hospital.

Algumas enfermarias, como as de cirurgia, quemadados⁵⁴, bercário^{36,37} e as de clínica com doentes comatosos, imunodeprimidos, de terapia intensiva, são aquelas nas quais as infecções adquiridas no hospital se fazem mais numerosas²⁷, por falhas de resistência dos pacientes e pela grande agressão de procedimentos diagnósticos e terapêuticos a que são sujeitos.

A etiologia das infecções causadas por bactérias aeróbias adquiridas no hospital é, em nossos dias, fundamentalmente relacionada a germes gram-negativos: enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa*⁸. As doenças infecciosas causadas por *Staphylococcus aureus* foram mais numerosas até 1965^{7,42,51}. Desde então, provavelmente em decorrência, em primeiro lugar, da pressão antibiótica^{19,33} mais efetiva no combate a microrganismos gram-positivos, a incidência e prevalência de infecções determinadas por gram-negativos aumentaram muito. No mesmo sentido, atuou a pressão exercida pelo uso dos germicidas^{6,25,29} hospitalares, igualmente mais eficientes na erradicação de bactérias gram-positivas.

De importância epidemiológica capital é a determinação das fontes de origem dos microrganismos agentes das infecções nosocomiais. Isto é, se *exógenas*^{39,47}, vindas do meio ambiente, originando

* Clínica de Doenças Tropicais e Infecciosas do Departamento de Dermatologia e Medicina Tropical do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, U.S.P., São Paulo, SP, Brasil.

** Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, Brasil.

*** Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina, U.S.P., São Paulo, SP, Brasil.

infecções *cruzadas*^{1,3,5,2}, das quais a população humana hospitalar é fonte e vetor, ou *endógenas*^{4,3,0}, quando os germes provêm do próprio paciente, instalando-se em órgãos de menor resistência e causando doença.

Os dados até agora existentes desautorizam qualquer afirmação da existência de uma flora hospitalar^{2,1,4,8,4,9}. Espécies e raças de bactérias causadoras de infecção não são exclusivas de dependências hospitalares^{3,8}; as proporções de infecções causadas por diferentes cepas bacterianas nos hospitais e nas comunidades externas podem diferir. Também neste aspecto falta unanimidade de pontos de vista^{2,2}.

Dados obtidos por alguns autores^{2,2,4,3,2,3,8,4,4,5,2} se generalizados, poderiam sugerir que, no decorrer da internação, os pacientes adquirem germes hospitalares que se integrariam às floras cutânea, respiratória e intestinal^{1,1}, representando papel preponderante na etiologia das infecções que seus hospedeiros viessem a contrair no nosocômio^{2,6}. A contaminação cruzada dos doentes daria origem ao aparecimento de infecções endógenas. A colonização de germes precederia a infecção^{1,4}.

Este trabalho foi feito em ambiente de enfermarias de atividade predominantemente não cirúrgica, pretendendo-se verificar se havia ou não alteração do número de portadores de germes, no decorrer da hospitalização. A avaliação foi feita com base em culturas de fezes e de material de 4 áreas não entéricas: duas respiratórias (nariz e garganta) e duas cutâneas (nuca e umbigo). Comparou-se o número de portadores de *Staphylococcus aureus* e o de bactérias aeróbias gram-negativas, em várias fases da hospitalização.

Por não ter sido acessível aos autores, não se fez tipificação dos germes, apresentando-se apenas o diagnóstico bacteriológico de espécie.

Material e Métodos

No período de 4 de março a 9 de outubro de 1969, com interrupção de 5 a 26 de agosto no referido período, foram examinados 85 pacientes internados nas enfermarias de Clínica Médica (Primeira e Segunda Clínicas Médicas), Neurologia e Doenças Tropicais e Infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Havia 48 homens e 37 mulheres, com idade variando entre 2 e 67 anos. A amostragem representou 5,1% dos 1.662 pacientes internados naqueles serviços, no período de tempo considerado.

O critério de seleção dos pacientes obedeceu apenas a dois requisitos: 1) a não internação em hospital, há pelo menos seis meses, contados a partir da data de admissão no Hospital das Clínicas, e 2) a existência de uma perspectiva segura de permanecer internados pelo menos 29 dias ininterruptos, fosse por necessidade terapêutica, de pesquisa ou de diagnóstico.

As principais doenças que motivaram as internações foram as seguintes: neuropatias: 26 casos; endocrinopatias: 12 casos; esquistossomose (hepatos-

plênica): 8 casos; doença renal: 8 casos; hipertensão arterial: 5 casos; insuficiência cardíaca congestiva: 4 casos; colagenoses: 4 casos; granulomatoses: 4 casos; neoplasia maligna: 3 casos; infecções: 3 casos; anemia ancilostom: 2 casos; diabetes mellitus: 2 casos; diagnósticos vários: 4 casos.

Admitido o paciente, colhia-se material no dia seguinte à internação, geralmente com menos de 18 horas de hospitalização. Após o banho habitual dos pacientes, entre sete e oito horas da manhã, era colhido material do nariz, garganta, nuca e umbigo entre 8,30 e 9,30 horas; fezes eram retiradas de material evacuado, geralmente no período matinal. Todas as coletas eram realizadas em dia preestabelecido (primeiro, oitavo, décimo quinto, vigésimo segundo e vigésimo nono dia de internação).

O grupo de pacientes dos quais foram analisadas as fezes ficou reduzido a 60 casos, pois não se conseguiu, dos 25 restantes, material adequado nas datas preestabelecidas. Preferiu-se não utilizar "swab" retal nessas oportunidades, com vista à preservação da uniformidade das condições de coleta de amostras.

Neste estudo, foram pesquisadas apenas bactérias aeróbias patogênicas; assim, excluíram-se de consideração outros agentes infecciosos de doença hospitalar (vírus, fungos e bactérias anaeróbias, por exemplo).

Não houve preocupação em correlacionar a população bacteriana dos pacientes e a do meio ambiente, o que tornaria necessário estudar as condições de instalações do hospital (pias, ralos, esgotos, alimentação, solo, maquinaria), do pessoal intra-hospitalar (para estafilococos nasais, por exemplo), de ventilação, etc.

Coleta de Material — A coleta do material de garganta, nariz e pelo foi efetuada por meio de estilete de alumínio, uma de suas extremidades envolvida em algodão hidrófilo, transportando-se o estilete em tubo estéril, dentro do qual se alojava outro tubo contendo algumas gotas de caldo ("Brain Heart Infusion-Oxoid"). Antes da coleta, umedecia-se o algodão do estilete no caldo, esgotando-se o excesso do meio na parede do tubo e friccionando-se a área de onde o material deveria ser colhido: no umbigo, por meio de dez movimentos circulares; na nuca, friccionando-se em movimento longitudinais realizados dez vezes, em cerca de 3 cm² de área, no limite da inserção capilar; na garganta, friccionando-se em movimentos circulares os pilares amigdalinos, o pálate mole e a úvula, por cinco vezes; no nariz, friccionando-se o vestíbulo nasal esquerdo por cinco vezes.

As fezes eram colhidas em recipiente estéril. Em alguns casos, houve necessidade de administração de supositórios de glicerina para provocar a evacuação.

Semeadura — O material colhido de garganta, nariz e áreas cutâneas foi semeado em placas de ágar-sangue e de ágar-manitol (Oxoid) e em caldo "(Brain Heart Infusion-Oxoid)". Com exceção do caldo, todos os outros meios eram incubados em atmosferas de CO₂ a 37°C. As placas de ágar-sangue eram examinadas depois de 24 e 48 horas de incubação, e as de ágar-manitol após 48 horas. Os tubos de

caldo eram examinados depois de 24 horas e repicados para placas contendo os meios mencionados que, por sua vez, eram incubadas como descrito.

As fezes foram semeadas em meios de McCONKEY (Oxoid), SS (Oxoid) e em tetrationato de KAUFFMANN (Oxoid). Estes meios eram incubados a 37°C, sendo examinadas as placas após 24 horas e o tetrationato repicado para placas de verde brilhante, que também eram conservadas na estufa a 37°C, durante 24 horas.

Identificação dos germes isolados — A identificação das bactérias gram-positivas foi baseada nas características das colônias, morfologia, coloração e produção da catalase. A prova confirmatória para *Staphylococcus aureus* foi produção de coagulase e, para *Streptococcus*, o tipo de hemólise, crescimento a 45°C e em caldo contendo cloreto de sódio a 6,5% e a sensibilidade à bacitracina. Quando necessários, outros recursos foram empregados.

A identificação dos gram-negativos foi efetuada inicialmente por intermédio das características culturais, morfo-tintoriais, provas de oxidação-fermentação, citocromo-oxidase e catalase. O grupo ou espécie era posteriormente identificado por meio de provas bioquímicas ou por outras características como, por exemplo, a produção de pigmentos.

Para as enterobactérias, foram feitas sistematicamente as provas de indol, VM, VP, citrato, H₂S, urease, lisina, fenilalanina, movimento, produção de gás em glicose e fermentação da lactose. Quando necessárias, foram empregadas técnicas sorológicas.

Análise estatística* — Na análise estatística dos dados foram utilizados modelos paramétricos de análises de variância**. As proporções (ou porcentagens) de pacientes com determinados microrganismos, foram transformadas em: $\theta = \arcsin \sqrt{p}$, isto é, em ângulos cujo seno é a raiz quadrada da proporção, a fim de permitir a utilização de modelos matemáticos da análise de variância.

Transformadas as observações e obtidas as novas escalas de valores, foram efetuados testes para verificar a homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) e a aditividade das mesmas (teste de Tuey).

Demonstradas as duas características, e não havendo qualquer evidência a indicar a existência de outra restrição à utilização de análise de variância, procedia-se à análise, de acordo com o modelo que nos parecia mais apropriado para cada uma das etapas do estudo.

Símbolos — Para simplificar a exposição do estudo, foram adotados os seguintes símbolos:

N = nariz; G = garganta; N' = nuca; U = umbigo; NG = nariz e garganta; N'U = nuca e umbigo; NGN'U = nariz, garganta, nuca e umbigo.

O termo estafilococo é usado como sinônimo de *Staphylococcus aureus*.

Dia de entrada — corresponde à manhã subsequente ao primeiro pernoite do doente no hospital.

Primeira fase de internação — é o espaço de tempo

que decorre desde o primeiro até o décimo quarto dia de internação, inclusive. O primeiro dia de internação e o da entrada se equivalem. **Segunda fase de internação** — é o tempo que decorre desde o décimo quinto até o vigésimo oitavo dia de internação, inclusive. **Dias de coleta de material** — o da entrada, oitavo, décimo quinto, vigésimo segundo e vigésimo nono dia. Como as coletas eram efetuadas de manhã, considera-se o término das fases de internação o dia anterior às coletas do décimo quinto e do vigésimo nono dia.

Resultados

Os pacientes foram distribuídos de acordo com a presença ou a ausência de germes e segundo o local de onde se obteve o material cultivado, nas diversas fases do estudo.

1. Estafilococos e germes gram-negativos, obtidos de NGN'U

Consideradas as áreas de NGN'U, 85 pacientes apresentaram estafilococos e germes gram-negativos aeróbios patogênicos, segundo as proporções percentuais apresentadas na Tabela 1. A análise de variância

Tabela 1

Distribuição percentual de pacientes de acordo com a presença ou ausência de germes, segundo local cultivado nas várias fases de estudo, na população de 85 pacientes.

Microrganismo	Fase	NG	N'U	NGN'U
Estafilococos	Entrada	42,3	20,0	45,9
	1ª	55,3	23,5	56,4
	2ª	50,6	30,6	52,9
	Nunca	31,8	48,2	27,0
Gram-Negativos	Entrada	29,4	1,2	29,4
	1ª	49,4	15,3	52,9
	2ª	54,1	22,3	57,6
	Nunca	24,7	68,2	21,1

dos dados dessa Tabela, apresentada na Tabela 1-a, mostra diferença altamente significativa ($p < 0,01$) no grupo de pacientes dos quais se isolaram germes, conforme a fase de internação. No decorrer da internação, obteve-se, em número maior de pacientes, o isolamento de germes em NGN'U. Os dados evidenciam também a existência de relação entre a tendência de aumento da frequência de germes durante o período de observação e o tipo de microrganismos isolados. É o que revela a interação significativa entre fases e microrganismo (Tabela 1-a). Com efeito, a análise das diferenças entre as proporções de pacientes com estafilococos e germes gram-negativos em NGN'U, de acordo com os períodos de internação, mostra que, enquanto a diferença

* A análise estatística dos resultados foi realizada na Divisão de Estatística do Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

** Os métodos e procedimentos utilizados são encontrados textos especializados, como por exemplo o de Snedecor & Cochran⁴¹

Tabela 1-a

Análise de variância para os dados da Tabela 1
Considerando - Entrada, 1ª e 2ª fases apenas

Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrados médios	F
Classif. principal		1229,00	—	
Microrganismo (M)	1	137,37	137,37	3,23
Sítio (S)	1	1049,07	1049,07	24,65
Erro	1	42,56	42,56	—
Sub-Classificação				
Fase (F)	1	308,58	154,29	21,95(*)
FXM	2	99,35	49,68	7,07(**)
Erro	4	28,11	7,03	—
TOTAL	11	1665,04	—	—

(*) Significante ao nível de 1%
(**) Significante ao nível de 5%

Tabela 1-b

Comparação entre valores médios dos dados da Tabela.

Microrganismo	FASE			
	E	1ª	2ª	TOTAL
Estafilococos	33,6	38,5	39,5	37,2
Gram-negativos	19,6	33,8	37,8	30,4
TOTAL	26,6	36,2	38,6	33,8
DIFERENÇAS		Média	Erro padrão	"t"
a) Entre microrganismos		6,8	3,8	1,79
b) Entre fases para estafilococos				
1ª e E		4,9	2,6	2,88
2ª e E		5,9	2,6	2,27(+)
Entre fases para gram-negativos				
1ª e E		14,2	2,6	5,46(*)
2ª e E		18,2	2,6	7,00(**)
c) Entre microrganismos, mesma fase				
Entrada		14,0	4,3	3,26
1ª		4,7	4,3	1,09
2ª		1,7	4,3	0,39

Valores críticos de t; ao nível de sign. de 0,05: $t_a=12,71$;
 $t_b = 2,78$; $t_c = 10,24$

(+) Significância fronteiriça $0,10 > p > 0,05$
(*) Significante ao nível de $P = 0,01$
(**) Significante ao nível de $P = 0,05$

Nota explicativa para as figuras 1 - 6: caso 1: presença de germes à entrada, primeira e segunda fase; caso 2: presença de germes à entrada e primeira fase; caso 3: presença de germes à entrada; caso 4: presença de germes à entrada e segunda fase; caso 5: presença de germes na primeira e segunda fase; caso 6: presença de germes na primeira fase; caso 7: presença de germes na segunda fase; caso 8: ausência de germes à entrada, primeira e segunda fase. NG = nariz-garganta; N'U = nuca-umbigo.

entre as percentagens de pacientes que apresentaram estafilococos em NGN'U na segunda fase, em relação à da entrada, é de significância estatística apenas fronteiriça ($0,1 > p > 0,05$), não se registrou diferença significante entre a situação na entrada e na primeira fase de internação (Tabela 1-b).

As diferenças entre as proporções de pacientes portadores de germes gram-negativos são altamente significantes ($p < 0,01$), da entrada para a primeira fase, como da entrada para a segunda fase da internação, denotando, portanto, nítido aumento do número de doentes portadores de germes gram-negativos, durante a hospitalização. Não se registra diferença significante entre as freqüências relativas de portadores de estafilococos e de germes gram-negativos em NGN'U, nas diversas fases de estudo.

A representação esquemática da distribuição da população de 85 pacientes, de acordo com a presença ou a ausência de estafilococos em NG e N'U, nas três fases estudadas, é apresentada em diagrama (Fig. 1). Idêntica representação, quanto à distribuição de microrganismos gram-negativos em NG e N'U (Fig. 2), revela nitidamente a acentuada diferença entre as proporções de indivíduos portadores de

DISTRIBUIÇÃO DE PACIENTES DE ACORDO COM A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE GERMES, SEGUNDO LOCAL CULTIVADO NAS VÁRIAS FASES DO ESTUDO.

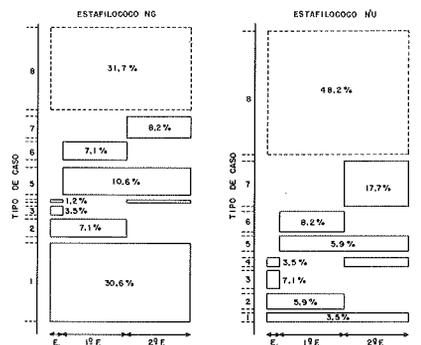


Fig. 1 - Diagrama da distribuição de estafilococos em NG e N'U

DISTRIBUIÇÃO DE PACIENTES DE ACORDO COM A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE GERMES, SEGUNDO LOCAL CULTIVADO NAS VÁRIAS FASES DO ESTUDO.

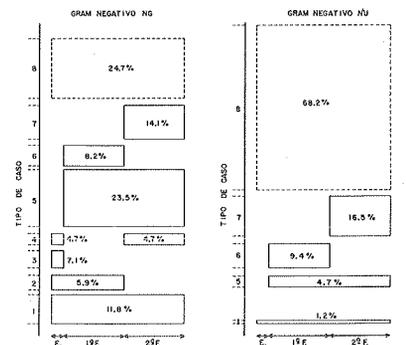


Fig. 2 - Diagrama da distribuição de gram-negativos em NG e N'U.

germes gram-negativos, quando se compara a entrada com a primeira fase do estudo e esta com a segunda. Na Fig. 3 é comparada, em diagrama, a distribuição de pacientes que tenham sido portadores de estafilococos e germes gram-negativos em NGN'U, nas três fases do estudo.

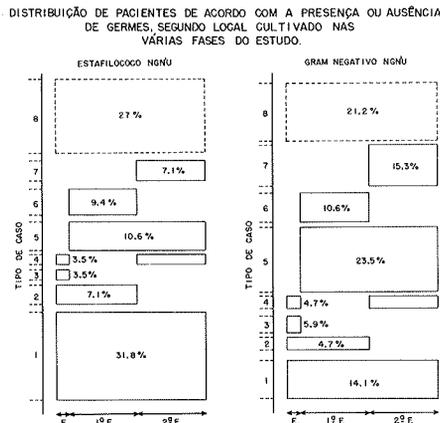


Fig. 3 - Distribuição comparada entre microrganismos em NGN'U.

2. Germes gram-negativos nas fezes

Escherichia coli - Não foi verificada grande diferença em número de pacientes portadores de *Escherichia coli* nas fezes, nas diversas fases do estudo (Tabela 2).

Tabela 2

Distribuição da população de 60 pacientes, conforme o isolamento de microrganismos das fezes, nas diferentes fases de estudo.

FASE	MICROORGANISMO (%)				
	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Proteus sp</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus</i> outros(*)
Entrada	83,3	53,3	28,3	15,0	13,3
1ª Fase	96,7	88,3	48,3	28,3	20,0
2ª Fase	93,0	81,7	51,6	38,3	13,3
Nunca	0,0	5,0	23,3	41,7	63,3

(*) *P. rettgeri*, *P. vulgaris*, *P.morganii*

A análise de variância destes dados encontra-se na Tabela 2-a. Analisaram-se, em relação a *Klebsiella* sp. e *Proteus* sp., as diferenças entre as proporções de pacientes dos quais se isolaram esses microrganismos nas fezes. Há diferença de significância fronteira ($0,05 < p < 0,10$) entre estas proporções segundo as fases durante a internação. Verifica-se, por outro lado, diferença significativa ($p = 0,05$) entre as frequências percentuais de pacientes portadores de *Klebsiella* sp. e de *Proteus* sp. Realizou-se também análise de variância, comparando os dados referentes a *Proteus* indol-negativos (*Proteus mirabilis*) e indol-positivos (*Proteus rettgeri*, *Proteus mor-*

ganii e *Proteus vulgaris*), não se evidenciando diferenças significativas entre o número de pacientes nos quais foram isolados nas fezes, nas diversas fases de internação, os dois grupos citados do gênero *Proteus* (por esse motivo a análise de variância não é apresentada).

Tabela 2-a

Análise de variância dos dados da Tabela 2 considerando Entrada, 1ª e 2ª fases, apenas, excluída *E. coli*.

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F
Fase	2	372,52	186,26	11,56(+)
Microrganismo	1	592,03	592,03	36,75(*)
Erro	2	32,21	16,11	-
TOTAL	5	996,76	-	-

(+) Significância fronteira $0,05 < p < 0,10$

(*) Significância ao nível de $p = 0,05$

E. coli foi encontrada em pacientes em pelo menos uma fase de internação. Em 16,7% dos doentes não se isolou *Escherichia coli* das fezes à entrada ao hospital, enquanto em 6,6% não se isolou *Escherichia coli* das fezes, na segunda fase de internação. Setenta e cinco por cento dos pacientes mostraram-se portadores de *Escherichia coli* nas três fases de internação. Na Fig. 4 são apresentados esses dados em diagrama.

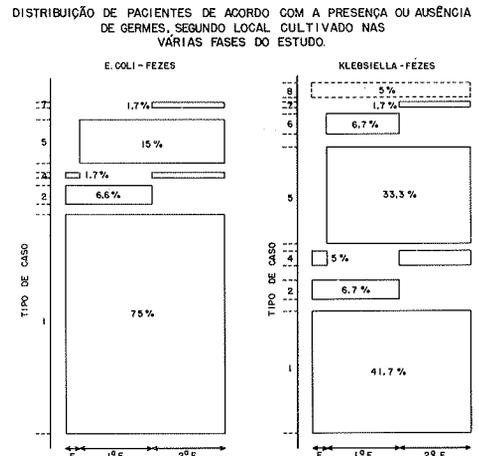


Fig. 4 - Diagrama da distribuição de *E. coli* e *Klebsiella* sp. das fezes.

Klebsiella sp. - Não se isolou *Klebsiella* sp. das fezes de 5% dos pacientes, nas três fases da internação. Não se comprovou estado de portador de *Klebsiella* sp. em 46,7% dos pacientes, à entrada ao hospital; 11,7% não se mostraram portadores na primeira fase da internação e 18,3% não eram portadores na segunda (Tabela 2). Na Fig. 4 são encontrados esses dados em diagrama.

Proteus sp. — Não se demonstrou, em nenhuma ocasião, estado de portador de *Proteus* sp. em 23,4% dos pacientes; 50% deles não eram portadores desses microrganismos à entrada do hospital; também não foi demonstrado em 51,7% e 50%, respectivamente na primeira e na segunda fase de internação (Tabela 2). Na Fig. 5 esses dados são apresentados em diagrama.

DISTRIBUIÇÃO DE PACIENTES DE ACORDO COM A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE GERMES, SEGUNDO LOCAL CULTIVADO NAS VÁRIAS FASES DO ESTUDO.

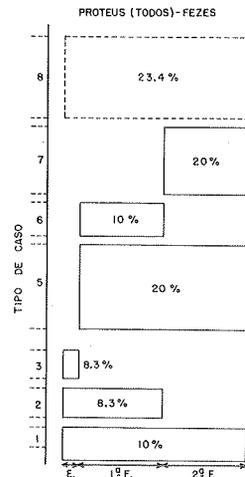


Fig. 5 — Diagrama da distribuição de *Proteus* sp.

O estudo da situação referente a *Proteus mirabilis* demonstrou que 41,7% dos pacientes não eram portadores desse germe nas fezes, durante a internação; na entrada ao hospital, não foi isolado em 85% dos pacientes; também não foi demonstrado em 71,7% e 51,7%, respectivamente, na primeira e na segunda fase de internação (Tabela 2). Esses dados são apresentados em diagrama na Fig. 6.

DISTRIBUIÇÃO DE PACIENTES DE ACORDO COM A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE GERMES, SEGUNDO LOCAL CULTIVADO NAS VÁRIAS FASES DO ESTUDO.

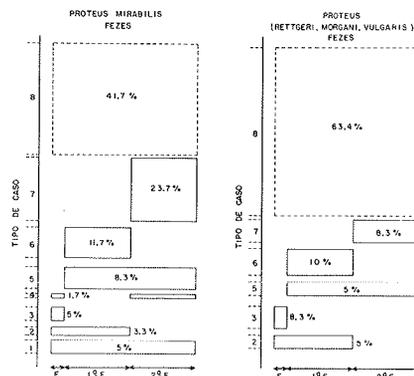


Fig. 6 — Diagrama da distribuição de *Proteus* spp.

3. Outros resultados

A referência a isolamento de outros microrganismos é feita no sentido de serem os achados bacteriológicos apresentados por completo. Esses dados não

foram submetidos a estudo pormenorizado.

3.1. Germes isolados de NGN'U

Streptococcus beta-hemolítico — Isolado de 12 pacientes, sempre e apenas em NG. Na entrada: dos pacientes de número 19, 41, 45, 46, 47, 52, 56 e 79. Na primeira fase de internação: dos pacientes de número 5 e 66. Na segunda fase de internação: dos pacientes de número 14 e 37.

Streptococcus faecalis — Isolado uma só vez, em NG (paciente de número 14, à entrada).

Pseudomonas aeruginosa — Isolada em NG, dos seguintes pacientes: nº 4, na segunda fase de internação; nº 8, na primeira e segunda fases de internação; nº 14, na entrada; nº 59, na segunda fase de internação; e nº 73, na primeira fase de internação. Foi isolada em N'U, dos seguintes pacientes na segunda fase de internação: nº 8, nº 59 e nº 73.

Serratia marcescens — Isolada em NG, dos seguintes pacientes: nº 57, na primeira e segunda fases de internação e nº 86, na entrada e primeira fase de internação. Em N'U, foi isolada do paciente nº 63, na primeira fase de internação.

Aerobacter aerogenes — Foi isolado do paciente nº 69, na primeira fase de internação.

3.2. Germes isolados das fezes

Staphylococcus aureus — Paciente nº 4, na segunda fase de internação; nº 9, na entrada, e nº 11, na primeira e segunda fases de internação.

Shigella flexneri — Pacientes nº 6, na entrada e primeira fase de internação, e nº 25, na segunda fase de internação.

Pseudomonas aeruginosa — Paciente nº 8, na segunda fase de internação.

Aerobacter aerogenes — Paciente nº 32, na segunda fase de internação.

O encontro dos microrganismos gram-negativos citados (*Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Aerobacter aerogenes* e *Shigella flexneri*) contribuiu para a classificação dos pacientes, segundo a distribuição de germes gram-negativos nas áreas de NGN'U, em que foram classificados. Em relação à situação de portadores fecais, esses dados não alteraram a classificação de nenhum dos pacientes.

Discussão

Na população de pacientes estudada, observou-se acréscimo do número dos que apresentavam microrganismos nas diversas áreas consideradas ($p < 0,01$), comparando-se os dados obtidos na entrada ao hospital e nas várias fases de internação (Tabelas 1 e 1-a). Esse fato foi verificado em relação a estafilococos isolados de NGN'U de 85 pacientes. O número de doentes que albergavam estafilococos, na segunda fase do estudo, foi maior que na entrada. Não houve, entretanto, diferença quanto ao número de pacientes a partir dos quais se recuperaram esses microrganismos, comparando-se os dados da entrada e da primeira fase do estudo. A significância da diferença citada foi fronteira ($0,1 > p > 0,05$) (Tabela 1-b). Muito mais marcante foi a diferença

— altamente significativa — do número maior de pacientes portadores de germes gram-negativos em NGN'U, durante as fases de internação hospitalar ($p < 0,01$) (Tabela 1-b).

Quando estudada a situação de pacientes portadores de bactérias gram-negativas aeróbias nas fezes, verificou-se diferença de significância fronteiriça, comparando-se o número maior de pacientes ($0,1 > p > 0,05$) portadores de *Klebsiella* sp. e *Protéus* sp., durante a internação hospitalar com o da entrada (Tabela 2-a). Não se encontrou diferença significativa para a distribuição de pacientes, nas diversas fases do estudo, conforme fossem portadores de *Proteus mirabilis* ou de *Proteus* indol-positivos.

A problemática da colonização por germes de doentes hospitalizados tem sido objeto de estudo nos últimos anos. Serão revisados alguns dos argumentos pertinentes ao assunto à sua eventual e provável consequência, de enorme importância prática, qual seja, a da infecção adquirida no hospital. Discutiremos aspectos relativos à colonização por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella* sp.. No tocante à situação intra-hospitalar do gênero *Proteus*, há publicações sobre surtos hospitalares de doença por ele causada. Para *Proteus mirabilis*, os tipos colicinogênicos 6 e 9 foram encontrados como causadores mais freqüentes para infecções adquiridas no hospital. Para as outras espécies de *Proteus*, para *Serratia marcescens* e para outras enterobactérias os dados não são ainda conhecidos. *Staphylococcus aureus* — Williams & col.^{5,2} observaram que, para os pacientes submetidos a cirurgia, e não portadores de estafilococos nasais em qualquer ocasião, 1,3% apresentou infecções estafilocócicas nas incisões cirúrgicas. Para os pacientes portadores do mesmo fagotipo de estafilococos no nariz, à admissão e durante a internação, a taxa de infecção estafilocócica de feridas cirúrgicas foi de 3,4%. Para os pacientes não portadores à admissão, e que adquiriram estafilococos nasais durante a internação, a taxa de infecção foi de 11,9%; para os que apresentavam estafilococos nasais, à entrada ao hospital, mas que tiveram sua colonização substituída durante a internação por outra cepa de estafilococos, a porcentagem de pacientes com infecções estafilocócicas nas incisões foi de 12,4%.

A aquisição nasal de estafilococos, segundo a verificação de Lidwell & col.^{2,4}, talvez não se faça atualmente, conforme o modelo epidemiológico de há 10 anos. A permanência na enfermaria não torna maior o número de portadores, mas faz notar a predominância de colonizações e infecções causadas pelo fagotipo 84/85, do fagogrupo III.

Seth & col.^{3,5} estudaram, em enfermaria de obstetrícia, a aquisição de estafilococos hospitalares por parte das gestantes. Estudaram 230 pacientes que, à admissão ao hospital, eram portadoras de estafilococos nasais na porcentagem 33,7%. Após quatro a cinco dias de hospitalização, o percentual de portadoras nasais de estafilococos passou a 45,9%, tendo 35,3% das pacientes adquirido raças hospitalares, fato avaliado a partir de fagotipagem e an-

tibiograma. Os fagotipos de resistência múltipla, no estudo efetuado na Índia^{3,5}, pertenciam, de forma preponderante, ao grupo III e apareceram em 31,5% das amostras obtidas das pacientes internadas, frente a 7,5% de cepas com o mesmo comportamento, no dia da entrada ao hospital. Relataram os autores 58% de amostras resistentes à penicilina G, no dia de admissão ao hospital, e 88,8% resistentes a esse antibiótico, nas amostras isoladas durante a internação.

Machado & col.^{2,7} estudaram três grupos de crianças, cada um dos quais constituído de 15 indivíduos: um, de crianças internadas em enfermaria de Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e outro, de crianças que, no dia da coleta de material, compareciam pela primeira vez ao hospital. A prevalência de portadores nasais, os padrões fagotípicos e os tipos de antibiograma foram parecidos para os dois grupos e mais a um terceiro, de pacientes infantis, ambulatoriais; o padrão do comportamento geral da colonização estafilocócica foi semelhante para os três grupos.

O achado de que os pacientes eram portadores de *Staphylococcus aureus* no nariz foi fator de menor importância ($0,1 > p > 0,05$) na observação de Davidson & col.^{1,2} para que os doentes viessem a apresentar infecção no pós-operatório. Esse estudo foi prospectivo e computadorizado para 1000 operações^{1,2}. No mesmo trabalho não se observou qualquer significância do encontro de agentes patogênicos na pele, prévio à cirurgia, sobre a incidência de infecções no pós-operatório.

Escherichia coli — A presença de *Escherichia coli* nas fezes de seres humanos é praticamente universal. A discussão sobre a existência de uma flora distinta dentro do hospital, em relação à observada fora dele foi cogitada. Kenedy & col.^{2,1} opinaram que os sorogrupos mais freqüentemente responsáveis por infecções hospitalares não entéricas (04, 06 e 075) estão mais concentrados, constituindo propriamente uma flora hospitalar. O grupo 01 foi o mais freqüente, excepcionalmente, em participantes da comunidade, isto é, em pessoas que se encontravam fora do hospital, enquanto os demais sorogrupos estavam distribuídos de maneira quantitativamente semelhante dentro e fora do hospital. Os sorogrupos de *Escherichia coli* 04, 06 e 075 estavam mais comumente associados às infecções urinárias adquiridas em hospital do que os outros sorogrupos. Os sorogrupos 04, 06 e 075 comportavam-se, no estudo de Kennedy & col.^{2,1}, semelhantemente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella-Aerobacter*, *Proteus* e *Citrobacter*, quanto à sua associação com o hospital e à propensão de causar infecções adquiridas no âmbito hospitalar. Concluíram ainda que as infecções urinárias, determinadas por *Escherichia coli*, estão, com freqüência, associadas à colonização fecal pelo mesmo microrganismo. As infecções urinárias, causadas por outros germes, foram comumente adquiridas de fontes externas. Um grupo de autores publicou, de 1962 a 1969, estudos sobre a epidemio-

logia de *Escherichia coli* em hospital e a situação dessa bactéria como agente de infecções hospitalares, especialmente as das vias urinárias. Resumindo as observações Turck & col.^{4,9} estabeleceram a seguinte opinião: as observações efetuadas desde 1961 mostraram que os sorogrupos de *Escherichia coli* 04,06 e 075 eram mais prevalentes nas fezes de indivíduos da comunidade^{4,8}. Quando as condições do hospedeiro eram apropriadas, esses microrganismos tendiam a provocar infecções não entéricas muito mais freqüentemente que outros grupos de *Escherichia coli*. No período de 1964 a 1966, fizeram uma série de observações relatando os reservatórios, as modalidades de infecção cruzada e os fatores que interferem na persistência desses germes nos indivíduos hospitalizados^{5,3}. Concluíram que os reservatórios de *Escherichia coli* 04, 06 e 075, dentro do hospital, eram esparsos, que o seu isolamento de objetos inanimados era muito infreqüente e a bactéria não era mais prevalente em enfermarias de clínica cirúrgica do que em enfermarias de clínica médica. O único parâmetro que teve correlação com a colonização das fezes dos pacientes por esses microrganismos foi o do uso de antibiótico de largo espectro. No último estudo, levado a efeito em 1968, por Turck & col.^{4,8} o carreamento nas fezes de *Escherichia coli* 04, 06 e 075 na época de admissão ao hospital era de 34% do total de pacientes; repetindo-se o exame ao final da internação, essa porcentagem não sofreu alteração significativa. Com internações de até 21 ou mais dias, a porcentagem de pacientes portadores desses sorogrupos de *Escherichia coli* variou de 24,1% a 40,1%. A aquisição dos grupos referidos não foi relacionada com sexo, idade, raça, doenças específicas de base atingindo os pacientes, grau de debilidade, estação do ano ou mesmo com tratamento antibiótico. Os autores sugeriram que a epidemiologia e ecologia das infecções por *Escherichia coli* estão constantemente mudando, à semelhança do que ocorre com as infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. Não há dúvida porém, para aqueles autores, que os grupos 04, 06 e 075 são os mais frequentes agentes responsáveis por infecção bacteriana por *Escherichia coli*, permanecendo a dúvida de serem ou não mais virulentos que outros sorogrupos desta espécie bacteriana, ou se, meramente, são eles responsáveis pela maioria de infecções não entéricas, por causa de sua maior prevalência. Cooke & col.⁹ não encontraram raças predominantes de *Escherichia coli* em portadores fecais e em casos de infecções urinárias em pacientes hospitalizados em enfermarias de clínica médica.

Spencer & col.^{4,3} estudaram a epidemiologia das infecções urinárias determinadas por *Escherichia coli* em enfermaria feminina de clínica médica. Concluíram pela presença de sorotipos 02, 06, 07, 018 e 075 distribuídos, sem predomínio de quaisquer deles, em infecções crônicas. Já nas infecções agudas predominava um ou outro sorotipo, observando-se ainda que, nas infecções crônicas, com freqüência, isolaram-se vários sorotipos simultaneamente, a partir

das mesmas amostras de urina.

Assinale-se, aqui, a observação de *Klebsiella* sp. ter sido reconhecida como germe de prevalência ascendente, surgindo como contaminante cada vez mais freqüente da flora respiratória e da pele, vindo a ser agente etiológico de graves infecções hospitalares¹⁰. Weil & col.⁵⁰ referem-se a surtos de infecções em hospital dos quais o agente etiológico é *Klebsiella* tipo 25. No estudo de Dans & col.¹⁰, referente às infecções por *Klebsiella aerogenes* no Boston City Hospital, durante o ano de 1967, verificou-se a presença endêmica de *Klebsiella* tipo 24, especialmente em enfermarias de serviços cirúrgicos; *Klebsiella* tipo 2 foi encontrada esparsamente por todos os serviços de medicina e de cirurgia; tanto o tipo 24 como o 2 de *Klebsiella* foram muito relacionados com a instrumentação endoscópica e com cateterismo urinário. *Klebsiella* tipo 26 foi encontrada freqüente e continuamente em todo o hospital. Em 1967, as cepas de *Klebsiella* eram menos sensíveis ao sulfato de kanamicina do que em 1964, mantendo-se sensíveis cerca de 2/3 delas; quase todas as cepas eram sensíveis ao sulfato de gentamicina.

Em berçário, após a média de 4 dias de internação, foi notada a colonização fecal de 90% (36 em 40) dos recém-nascidos³ por duas raças de *Klebsiella* sp., de sorotipos 2 e 11, kanamicina-resistentes. A investigação foi realizada após o encontro de *Klebsiella* sp. kanamicina-resistentes no sangue de 6 crianças. O modo de transmissão dos germes foi considerado o cruzado, através das mãos do pessoal hospitalar.

Em enfermaria de adultos, Selden & col.^{3,4} notaram os seguintes resultados em 162 pacientes sob observação:

(a) 30 doentes, quando internados, eram portadores de *Klebsiella* sp. nas fezes; 5 deles apresentaram infecções causadas por *Klebsiella* sp., sendo que, em 3, as raças causadoras foram as mesmas isoladas das fezes.

(b) 31 doentes colonizaram-se com *Klebsiella* sp., nas fezes depois de hospitalizados; 15 posteriormente apresentaram infecções causadas pelo mesmo germe que, em 14 dos doentes, era do mesmo sorotipo isolado das fezes.

(c) 101 doentes não tiveram infecções determinadas por *Klebsiella* sp.; 11 deles estavam colonizados pelo germe nas fezes, já na entrada ao hospital ou depois de internados.

Em doentes, no período pós-transplante de rim²⁸, mantidos hospitalizados ou não por períodos de 1 a 13 meses, não foi notada diferença do número de portadores fecais de *Klebsiella* sp., para os dois grupos.

Pseudomonas aeruginosa — Avaliando a colonização fecal por *Pseudomonas aeruginosa*, Stoodley & Thom^{4,4} encontraram 4% de positividade em 50 pessoas normais; 13,6% em 103 doentes não hospitalizados e 18,3% em 240 doentes internados em hospital. Em casos de necrópsia de doentes hospitalizados,

houve 36% de positividade. Foi usada metodologia especial para o isolamento do germe.

Diversos autores mencionam que um dos fatores fundamentais para a colonização fecal por esses germes gram-negativos é a antibioticoterapia prévia. Não pudemos confirmar essa assertiva, o que é objeto de outras publicações^{3,24,32,34,38,54}.

Shooter & col.³⁸ relatam que, durante sua permanência na enfermaria cirúrgica de homens, os pacientes podiam tornar-se portadores de novas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e desenvolver infecções clínicas com suas raças próprias de bactérias; sugeriram que estas novas raças poderiam resultar de transferência de um doente a outro, ou de infecção intestinal de diversos doentes a partir de uma fonte comum. Ficou confirmado que os doentes adquirem novas raças de *Pseudomonas aeruginosa*, durante sua permanência na enfermaria, que, como na observação anterior, grupos de doentes portaram uma raça comum durante o mesmo período de tempo. Os resultados alicerçariam a hipótese de que os doentes contaminaram o ambiente da enfermaria muito mais que o ambiente teria sido a fonte das raças. Doentes com ileostomias, colostomias e antibioticoterapia prévia pareceram mais predispostos à colonização com *Pseudomonas aeruginosa*.

Glover & Jolly¹⁶ estudaram a colonização do tracto respiratório por bacilos gram-negativos. De treze pacientes estudados, cinco tinham culturas positivas para organismos gram-negativos, na fase pré-operatório (38,5%) e onze vieram a dar culturas positivas para essas bactérias no pós-operatório (84,6%). Os materiais cultivados foram do nariz, garganta, escarro e aspirados de traquéia. Os treze pacientes haviam sido submetidos, durante a cirurgia, a entubação endotraqueal. Os tubos de entubação foram retirados, em todos os casos, na fase de recuperação pós-anestésica; todos os pacientes haviam sido submetidos a alguma forma de respiração assistida ou controlada. Todos os treze receberam infusões endovenosas e sete haviam sofrido cateterismo uretral. Os autores¹⁶ obtiveram 37,0% (10, de 27) de culturas positivas no pré-operatório e 46,9% (60, de 128) no pós-operatório dos 13 pacientes estudados. Não mencionaram as espécies bacterianas isoladas, nem fizeram avaliação da significância das diferenças das proporções encontradas.

Rose & Schreier³² estudaram o efeito da hospitalização e da terapêutica antibiótica sobre a flora fecal de 234 pacientes internados no Hospital de Veteranos de Wiscounsin, nos EUA. Estudaram 100 pacientes que permaneceram internados e outros 50 que não foram medicados com esse tipo de drogas. Desprezaram os dados referentes a *Escherichia coli*, já que consideraram sua presença como praticamente constante nas fezes humanas, sob todas as circunstâncias. No grupo de 50 pacientes que não haviam recebido terapêutica antimicrobiana, no decorrer da internação, não se demonstrou aquisição significativa de qualquer tipo de microrganismo fecal. Já no grupo que havia recebido terapêutica anti-

microbiana, observou-se acréscimo significativo quanto ao número de microrganismos fecais no vigésimo primeiro dia de internação, comparando-se esse resultado com a situação existente na época da internação. O número de pacientes portadores de *Klebsiella*, identificadas por tipagem como *Klebsiella pneumoniae*, passou de 10% à entrada para 34% no vigésimo primeiro dia de internação ($p = 0,05$). Os antimicrobianos que mais favoreceram o surgimento de maior número de portadores de flora fecal no referido hospital foram a ampicilina, a penicilina G e combinações antibióticas variadas. Rose & Schreier³² concluem admitindo que, excluída *Escherichia coli*, a aquisição de bacilos gram-negativos nas fezes de pacientes hospitalizados foi secundária ao uso terapêutico de antimicrobianos e não ocorreu somente por uma exposição à flora nosocomial. O encontro de bacilos gram-negativos nas fezes, segundo Rose & Schreier³², varia de dia para dia. A variação dos achados de *Proteus* sp. pode ter alteração diária de 11% a 75%.

Na pele, Stratford & col.⁴⁵ correlacionaram uma colonização muito maior em pacientes hospitalizados, por bacilos gram-negativos, com a gravidade de saúde física dos pacientes, quando a flora cutânea normal foi substituída por aeróbios gram-negativos. Em pacientes ambulatoriais psiquiátricos e nos pré-operatórios eletivos, encontraram predominância de *Staphylococcus aureus* sobre a flora de gram-negativos. Entre os acometidos de doença grave, sujeitos ou não a tratamento cirúrgico, a predominância de gram-negativos sobre estafilococos foi relevante. Os materiais de cultivo foram obtidos de nariz, garganta, axila e períneo. Assinalam um fato extraordinário: um paciente que apresentava flora superficial normal, adquiriu preponderantemente *Escherichia coli*, em duas horas após parada cardíaca. Na opinião dos autores, não houve influência da antibioticoterapia sobre a progressiva predominância de germes gram-negativos na flora superficial dos doentes graves. Nos pacientes de nossa casuística, houve nítido aumento do número de portadores cutâneos de gram-negativos, durante o período de internação, sem que estivesse a maioria deles em más condições de saúde.

As nossas observações estão em contradição com as de Johanson & col.²⁰, que não demonstraram aquisição de germes gram-negativos aeróbios na orofaringe da população hospitalizada que avaliaram. Esses autores verificaram aquisição de germes gram-negativos só nos pacientes em péssimas condições de saúde, admitindo, em conceito amplo, a "menor capacidade depurativa bacteriana dos mecanismos de defesa da orofaringe". Uma população de pacientes com agravos físicos, moderados ou leves, em grande parte comparável à de nossa casuística, além de indivíduos normais, ligados ou não ao hospital, e de doentes psiquiátricos, em comprometimento orgânico, não adquiriu germes gram-negativos, quando hospitalizada.

Os microrganismos colonizados nas vias aéreas superiores são responsáveis, pelo menos em parte,

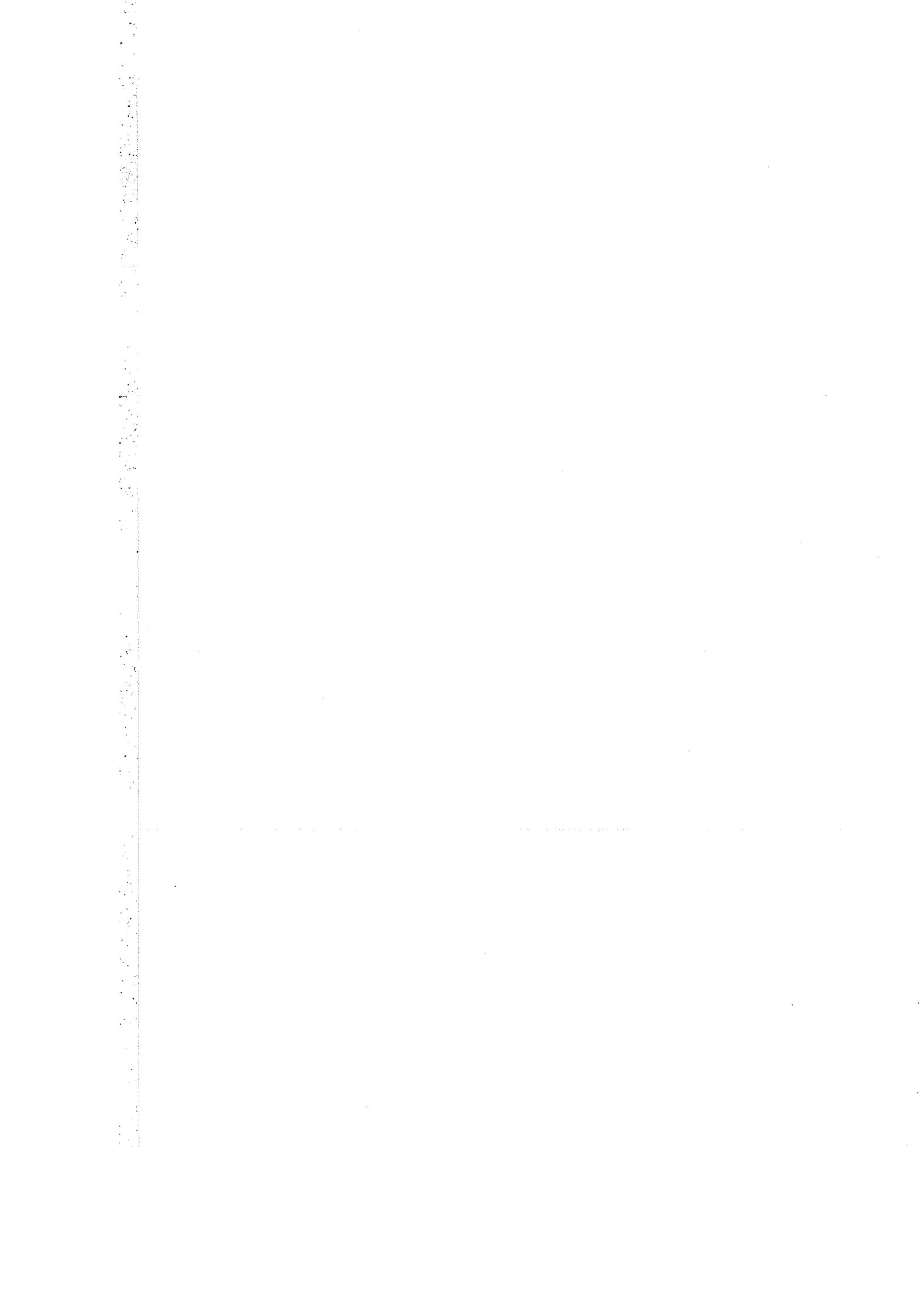
pela etiologia das pneumonias desses pacientes, sobretudo nas doenças muito graves.

O conjunto de trabalhos discutido parece favorecer o ponto de vista de que os doentes hospitalizados estão sujeitos à equisição de uma flora nas enfermarias, pelo menos quantitativamente diferente daquelas que eram portadores fora do hospital. Os nossos resultados confirmam essa opinião. É provável que a colonização por gram-negativos dentro do hospital concorra, epidemiologicamente, como fonte para o maior número de infecções hospitalares causadas por germes gram-negativos, como se observar atualmente.

Referências Bibliográficas

- ADLER, J.L.; BURKE, J.P. & FINLAND, M. — Infection and antibiotic usage at Boston City Hospital, January 1970. *Arch. Intern. Med.*, 127:460-465, 1971
- ADLER, J.L.; BURKE, J.P.; MARTIN, D.F. & FINLAND, M. — Proteus infections in a general hospital. II. Some clinical and epidemiological characteristics. *Ann. Intern. Med.*, 75:531-536, 1971.
- ADLER, J.L.; SHULMAN, J.A.; TERRY, P.M.; FELDMAN, D.B. & SKALITY, P. — Nosocomial colonization with kanamycin-resistant *Klebsiella pneumoniae*, types 2 and 11, in a premature nursery. *J.Ped.*, 77:376-385, 1970.
- ALTEMEIER, W.A.; CULBERTSON, W.R. & HUMMEL, R.P. — Surgical considerations of endogenous infections: sources, types, and methods of control. *Surg. clin. N.Amer.*, 48:227-237, 1968.
- BARRETT, F.F.; CASEY, J.I. & FINLAND, M. Infections and antibiotic use among patients at Boston City Hospital, February, 1967. *New Engl.J.Med.*, 278:5-9, 1968.
- BRUUN, J.N. — Post-operative wound infection. Predisposing factors and the effect of a reduction in the dissemination of staphylococci. *Acta med. scand., Suppl.* 514: 1-89, 1970.
- BURKE, J.P.; INGALL, D.; KLEIN, J.O.; GEZON, H.M. & FINLAND, M. — *Proteus mirabilis* infections in an hospital nursery traced to a human carrier. *New Engl.J.Med.*, 284:115-121, 1971.
- CASWELL, H.T.; GRÖSCHEL, D.; ROGERS, F. B.; LEARNER, N.; SCHRECK, K.M. & SHUMAN, C.R. A ten year study of staphylococcal disease. Surveillance, control, and prevention of hospital infections, 1956 to 1965. *Arch. environm. Hlth.*, 17:221-224, 1968.
- COOKE, E.M.; EWING, J. & SHOOTER R.A. Changing faecal population of *Escherichia coli* in hospital medical patients. *Brit.med.J.*, 4:593-595, 1969.
- DANS, P.E.; BARRETT, F.F.; CASEY, J.I. & FINLAND, M. — *Klebsiella-Enterobacter* at Boston City Hospital, 1967. *Arch intern. Med.*, 125:94-101, 1970.
- DATTA, N. — Drug resistance and R factors in the bowel bacteria of London patients before and after admission to hospital. *Brit.med.J.*, 2:407-411, 1969.
- DAVIDSON, A.I.G.; CLARK, C. & SMITH, G. — Postoperative wound infection: a computer analysis. *Brit.J.Surg.*, 58:333-337, 1971.
- EDMUNDS, P.N. — Staphylococcal infection in subdivided general surgical wards. *J.Hyg. (Camb.)*, 68:531-547, 1970.
- FEINGOLD, D.S. — Hospital-acquired infections. *New Engl. J.Med.*, 283:1384-1391, 1970.
- GARDNER, P. & SMITH, D.H. — Studies on the epidemiology of resistance (R) factors. I. Analysis of *Klebsiella* isolate in a general hospital. II. A prospective study of R factors transfer in the host. *Ann. intern.Med.* 71:1-8, 1969.
- GLOVER, J.L. & JOLLY, L. — Gram negative colonization of the respiratory tract in postoperative patients. *Amer.J.med.Sci.*, 261:24-26, 1971.
- HUGHES, W.H. — The irreducible minimum in cross-infection control and isolation nursing. *J.Hyg.(Camb.)*, 68:379-392, 1970.
- HUTZLER, R.U. — *Staphylococcus aureus* e Bactérias Gram-negativas em pacientes hospitalizados. (Tese dout. Fac. Med. Universidade de São Paulo), São Paulo, 1971
- ISENBERG, H.D. & BERKMAN, J.I. — The role of drug-resistant and drug-selected bacteria in nosocomial disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 176:52-58, 1971.
- JOHANSON, W.G.; PIERCE, A.K. & SANFORD, J.P. Changing pharyngeal bacterial flora of hospitalized patients. *New Engl. J. Med.*, 281:1137-1140, 1969.
- KENNEDY, R.P.; FLORDE, S.J. & PETERSDORF, R.G. — Studies on the epidemiology of *Escherichia coli* infections. IV. Evidence for a Nosocomial flora. *J.clin. Invest.*, 44:193-201, 1965.
- KESSNER, D.M. & LEPPER, M.H. — Epidemiologic studies of gram-negative bacilli in the hospital and community. *Am.J.Epidemiol.*, 85:45-60, 1967.
- KISLAK, J.W.; EICHOFF, T.C. & FINLAND, M. Hospital acquired infections and antibiotics usage in the Boston City Hospital, January, 1964. *New Engl.J.Med.*, 271:834-835, 1964.
- LIDWELL, O.M.; POLAKOFF, S.; DAVIES, J.; HEWITT, J.H.; SHOOTER, R.A.; WALKER, K.A.; GAYA, H. & TAYLOR, G.W. — Nasal acquisition of *Staphylococcus aureus* in a subdivided and mechanically ventilated ward; endemic prevalence of a single staphylococcal strain. *J.Hyg. (Camb)*, 68:417-433, 1970.
- LIGHT, I.J.; SUTHERLAND, J.M.; COCHRAN, M.L. & SUTORIUS, J. — Ecological relation between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas* in a nursery population. *New Engl.J.Med.*, 278:1243-1247, 1968.
- LOWBURY, E.J.; THOM, B.T.; LILLY, H.A.; BABB, J.R. & WHITTALL, K. — Sources of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with tracheostomy. *J.med.Microbiol.* 3:39-56, 1970.
- MACHADO, E.M.; SOLÉ-VERNIN, C.; ULSON, C.M.; GOUVEA, F.P.; COELHO, H.S.; CONCEIÇÃO, J.A.N.; SILVA, J.A. & NEVES, F.P., Fo. — Estudos sobre as estafilocóccias. I. Levantamento preliminar na Enfermaria de pediatria do Hospital Geral. Prevalência de portadores, antibiograma e fagotipagem das amostras obtidas. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S.Paulo*, 65:38-56, 1960.
- MONTGOMERIE, J.Z.; DOAK, P.B.; TAYLOR, D.E.M.; NORTH, J.D.K. & MARTIN, W.J. — *Klebsiella* in faecal flora of renal transplant patients. *Lancet*, 2: 787-791, 1970.
- NOONE, P.; GRIFFITHS, R.J. & TAYLOR, C.E.D. Hexachlorophane for treating carriers of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 1:1202-1203, 1970.
- POLAKOFF, S.; RICHARDS, I.D.; PARKER, M.T. & LIDWELL, O.M. — Nasal and skin carriage of *Staphylococcus aureus* by patients undergoing surgical operation. *J.Hyg.(Lond.)*, 65:559-566, 1967.
- RILEY, H.D., Jr. — Hospital-associated infections. *Pediat. Clin.N.Amer.*, 16:701-734, 1969.
- ROSE, H.D. & SCHREIER, J. — The effect of hospitalization and antibiotic therapy on the gram-negative fecal flora. *Amer.J.med.Sci.*, 255:228-236, 1968.
- SHECKLER, W.E. & BENNETT, J.V. — Antibiotic usage in seven community hospitals. *J.Amer.med.Ass.*, 213:264-267, 1970.
- SELLEN, R.; LEE, S.; WANG, W.L.L.; BENNETT, J.V. & EICKHOFF, T.C. — Nosocomial *Klebsiella* infections: intestinal colonization as a reservoir. *Ann.*

- intern.Med.*, 74:657-664, 1971.
35. SETH, V.; RAY, B.G. & WALIA, B.N.S. — Maternal staphylococcal carriage in a maternity unit. *Indian J.med.Res.*, 56: 1502-1510, 1968.
36. SHALLARD, M.A. & WILLIAMS, A.L. — A study of the carriage of gram-negative bacilli in a ward for newborn babies in hospital. *Med.J.Aust.*, 1:540-542, 1965.
37. SHALLARD, M.A. & WILLIAMS, A.L. — Studies on gram-negative bacilli in a ward for newborn babies. *Med.J.Aust.*, 2:455-459, 1966.
38. SHOOTER, R.A.; COOKE, E.M.; GAYA, K.; KUMAR, P.; PATEL, N.A.; PARKER, M.T.; THOM, B.T. & FRANCE, D.R. — Food and medicaments as possible sources of hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*, 1:1227-1229, 1969.
39. SHOOTER, R.A.; ROUSSEAU, S.A.; COOKE, E.M. & BREADEN, A.L. — Animal sources of common serotypes of *E.coli* in the food of hospital patients. Possible significance in urinary tract infections. *Lancet*, 2:226-228, 1970.
40. SHOOTER, R.A.; WALKER, K.A.; WILLIAMS, V.; HORGAN, G.; PARKER, M.T.; ASHESHOV, E. & BULLIMORE, J. — Faecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital patients. *Lancet*, 2:1331-1334, 1966.
41. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. — Statistical methods. 6th. edition. Iowa, Iowa State University, 1967.
42. SOLÉ-VERNIN, C. & UTHIDA TANAKA, A.M. — A prova de Moore conjugada ao antibiograma na identificação das amostras hospitalares e não hospitalares de *Staphylococcus aureus*. *Hospital (Rio de J.)*, 75:163-206, 1969.
43. SPENCER, A.G.; MULCAHY, D.; SHOOTER, R.A.; O'GRADY, F.W.; BETTLEHEIM, K.A. & TAYLOR, J. *Escherichia coli* serotypes in urinary tract infection in a medical ward. *Lancet*, 2:839-842, 1968.
44. STOODLEY, B.J. & THOM, B.T. — Observations on the intestinal carriage of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.med. Microbiol.* 3:367-375, 1970.
45. STRATFORD, B.; GALLUS, A.S.; MATHIESSON, A.M. & DIXSON, S. — Alteration of superficial bacterial flora in severely ill patients. *Lancet*, 1:68, 1968.
46. THOBURN, R.; FEKETY, F.R., Jr.; CLUFF, L.E. & MELVIN, V.B. — Infections acquired by hospitalized patients. *Arch. intern. Med.*, 121: 1-10, 1968.
47. TOP, F.H. — The hospital environment — A crossroads for infection. *Arch.Environ.Hlth.*, 21:678-688, 1970.
48. TURCK, M. & PETERSDORF, R.G. — The epidemiology of non enteric *Escherichia coli* infections. Prevalence of serological groups. *J.clin.Invest.*, 41:1760-1765, 1962.
49. TURCK, M.; RONALD, A.R.; CLARK, H.; WINTERBAUER, R.H.; ATLAS, E.; SILVERBLATT, F. & PETERSDORF, R.G. — Studies on the epidemiology of *Escherichia coli* 1960-1968. *J.infec. Dis.*, 120:13-16, 1969.
50. WEIL, A.I.; RAMCHAND, S. & ARIAS, M.E. Nosocomial infection with *Klebsiella* type 25. *New Engl. J.Med.*, 275:17-21, 1966.
51. WILLIAMS, R.E.O.; BLOWERS, R.; GARROD, L.P. & SHOOTER, R.A. — Hospital Infection. Causes and prevention. 2nd. edition. London, Lloy and Luke, 1966.
52. WILLIAMS, R.E.P.; NOBLE, W.C.; JEVONS, M.P.; LIDWELL, O.M.; SHOOTER, R.A.; WHITE, R.G.; THOM, B.T. & TAYLOR, G.W. — Isolation for the control of staphylococcal infection in surgical wards. *Brit.med.J.*, 2(1):275-282, 1962.
53. WINTERBAUER, R.H.; TURCK, M. & PETERSDORF, R.G. — Studies on the epidemiology of *Escherichia coli* infection. V-Factors influencing acquisition of specific serologic groups. *J.clin.Invest.*, 46:21-29, 1967.
54. WORMALD, P.J. — The effect of a changed environment of bacterial colonization rates in an established burns centre. *J.Hyg.(Camb.)*, 68:633-645, 1970



Transcrição gênica em bactérias*

Walter Colli**

Resumo

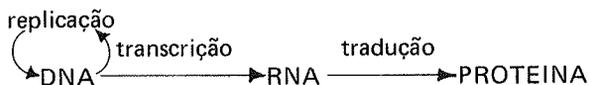
Os artigos mais importantes, referentes à transcrição gênica em organismos procariotas, foram revisados. Perguntas fundamentais, que devem ser feitas no estudo de processos transcritivos, são discutidas. O modelo de regulação do operon da lactose, que inclui os conceitos de regulação negativa e positiva, é apresentado. A estrutura da RNA polimerase é descrita, dando-se ênfase ao papel de suas diversas subunidades. As funções de σ na ligação com o DNA "template", de ρ nos processos de terminalização, de ψ na transcrição de genes RNA ribossômico, e de CAP no controle positivo da transcrição são discutidas.

Summary

Gene transcription in bacteria

Gene transcription in procaryotic organisms is reviewed. Fundamental questions that must be made when one studies transcriptive processes are discussed. The model of regulation of the lactose operon, which includes the concepts of negative and positive regulation is presented. A description of the structure of RNA polymerase is given, with emphasis on the role of its many subunits. The function of σ in the binding with the DNA template, of ρ in the termination process, of ψ in the transcription of ribosomal RNA genes, and of CAP in the positive control of transcription is also included.

O termo transcrição é usado comumente para exprimir o processo pelo qual a informação contida na molécula de DNA é copiada durante a síntese de RNA. Ao contrário da replicação, que envolve síntese de uma molécula de DNA e está diretamente relacionada com a transmissão da informação às linhagens descendentes, a transcrição define a cópia da informação gênica numa molécula de RNA complementar que irá, em última análise, dirigir a construção da estrutura primária das proteínas sintetizadas pela célula. Essa conceituação desenvolveu-se na década de 1950, quando foi proposto modelo para explicar o fluxo de informação no interior de uma célula:



Fica evidente, através de um simples exame do modelo acima, que a síntese de uma proteína específica, produto final da expressão de um gene, pode ser controlada através de processos que interferem com a transcrição, com a tradução ou com ambas. Entretanto, está cada vez mais claro que, nas células bacterianas (procariotas em geral), o controle se dá principalmente ao nível da transcrição.

* Símbolos e abreviações usadas: β (Beta), σ (Sigma), α (Alfa), ρ (Ro), ω (Omega), ψ (Psi), ϕ (Fi), λ (Lambda), DNA (ácido desoxirribonucleico), RNA (ácido ribonucleico), ATP (adenosina trifosfato), PPGPP (guanosina tetrafosfato), 3'5' AMP (adenosina monofosfato cíclico), CAP ("catabolite activating protein").

** Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, U.S.P., São Paulo, SP, Brasil.

É necessário dizer que, por transcrição, entende-se também a síntese de espécies estáveis de RNA, ou seja RNA de transferência (tRNA) e RNA ribossômico (rRNA). Desde o trabalho clássico de Burgess⁸, sabe-se que, em procariotas, existe apenas uma RNA polimerase que é capaz de catalisar a transcrição de qualquer uma das espécies de RNA.

De um modo geral, devem ser feitas as seguintes perguntas quando se estuda um processo transcritivo^{1,7}:

1 - Quais são as unidades de transcrição?

No momento atual, tenta-se responder a essa pergunta, estudando-se o tamanho do RNA sintetizado e a localização da porção do genoma na qual se processou a transcrição. Isto implica também no conhecimento do local onde se iniciou e onde terminou a síntese de uma espécie particular de RNA. Finalmente, é escopo desse primeiro item saber qual a seqüência nucleotídica do RNA sintetizado, tarefa mais difícil de ser realizada e que está sendo focalizada em alguns casos especiais^{2,3,4,5,6}.

2 - Qual é a função de cada RNA sintetizado?

Não satisfaz ao pesquisador saber apenas como e onde um RNA particular é sintetizado. Há necessidade de estabelecer-se a correlação entre ele e a proteína a ser sintetizada. Nesse caso, é importante

saber se uma determinada molécula de RNA é traduzida integralmente ou se porções de sua seqüência nucleotídica permanecem silenciosas durante a tradução. Além disso, é possível que a molécula de RNA sofra modificações pós-transcricionais, antes de ser traduzida. Esse fenômeno, cuja existência é comprovada em células de eucariotas, é mais difícil de ser demonstrado em procariotas, embora já existam evidências de que, em alguns casos, o RNA sintetizado em procariotas seja maior que o RNA funcional, normalmente encontrado^{2,4,6,4}.

3 — Qual é a seqüência temporal, durante a qual transcritos individuais de RNA aparecem no ciclo de crescimento do organismo?

4 — Como são controladas a síntese das unidades transcritas e a expressão da seqüência temporal?

Essas duas perguntas são de enorme importância porque resvalam no problema do controle da expressão gênica. Para dar apenas um exemplo, vejamos o caso de algumas bactérias do gênero *Bacillus*. Em determinadas condições, essas bactérias se transformam em esporos que dão à espécie melhores condições de sobrevivência face a um ambiente desfavorável. Durante a esporulação, ocorre uma série de fenômenos bioquímicos: desaparecem os citocromos responsáveis pelo metabolismo aeróbico, com aparecimento de um novo sistema de transporte de elétrons; há redução da quantidade de ribossomos e a virtual paralisação da síntese de RNA ribossômico. Por outro lado, mensageiros específicos são transcritos no sentido de sintetizar enzimas responsáveis pelo aparecimento das estruturas específicas do esporo. A RNA polimerase da fase vegetativa é modificada em algumas de suas subunidades, alterando-se, provavelmente, a especificidade de transcrição^{4,8}. A esporulação é um fenômeno de diferenciação celular, talvez o mais simples de todos^{7,4}. O conhecimento do mecanismo molecular, pelo qual uma célula inicia e termina a expressão

de um gene, é de fundamental importância no entendimento do processo de diferenciação celular. Nesse sentido, as bactérias esporulantes constituem-se excelentes sistemas de estudo.

A organização da informação obtida na última década foi promovida e facilitada, pelo menos para os genes bacterianos, pela hipótese de Jacob & Monod^{4,0}. Na sua forma mais atual, a hipótese (Fig. 1) prediz que a unidade funcional da expressão gênica é o operon, representado pela seqüência linear de genes contíguos, responsáveis pela síntese de enzimas pertencentes à mesma via metabólica. Esses genes, chamados estruturais, seriam transcritos em conjunto, produzindo-se um RNA mensageiro (mRNA) único, policistrônico (poligênico). Na região do genoma onde tem início a transcrição, existe um agregado de "locais" regulatórios que parecem controlar se o operon deve ou não ser transcrito. Esses locais incluem o *sítio promotor*, no qual se liga a RNA polimerase para dar início ao processo transcritivo, e o *sítio operador*, no qual se exerce o *controle negativo* da transcrição, através da ligação com o *repressor*. O repressor, por sua vez, é o produto da atividade de um gene regulador que não precisa necessariamente estar próximo do operon, no genoma bacteriano. Resultados mais recentes indicam que, na região do genoma onde se encontra o *sítio promotor*, pode haver interação com fatores proteicos específicos, necessários para que a transcrição tenha início^{6,3,7,7}. Embora isso não possa ser generalizado, há fortes evidências de que em *E. coli* funcionem, dessa maneira, o operon da arabinose^{2,6} e o operon da lactose¹. Nesse último caso, utilizando-se de um sistema *in vitro*, que continha o operon da lactose purificado, RNA polimerase, nucleosídeos trifosfato, ribossomos, aminoácidos e RNA de transferência, foi possível demonstrar a síntese da enzima β -galactosidase, que é estimulada por um fator proteico (CAP), na presença de 3'-5' AMP cíclico^{1,9,7,7}.

Esses resultados vieram esclarecer o fenômeno, de

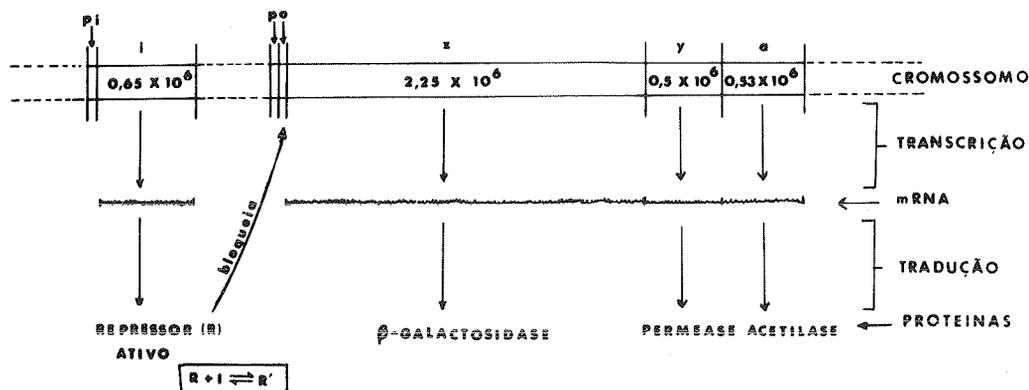


Fig. 1 — Esquema do operon envolvido na síntese de enzimas responsáveis pelo metabolismo da lactose em *E. coli*.

Os números indicam o peso molecular aproximado da dupla cadeia de DNA para cada gene. O gene regulador (i) e seu promotor (p_i) não estão ligados ao operon. Fazem parte do operon os genes estruturais z , y , a que contêm a informação para a síntese das enzimas β -galactosidase, permease e acetilase, respectivamente, o *sítio operador* (o) e o *sítio promotor* (p). A seqüência nucleotídica do *sítio operador* tem afinidade pelo repressor, que é o produto proteico do gene regulador. A transcrição do operon se dá desde que o *sítio operador* não esteja bloqueado pelo repressor (R), após a ligação da RNA polimerase ao *sítio promotor*. Isso ocorre quando a bactéria está em presença de lactose, ocasião em que o repressor tem sua afinidade pelo operador diminuída (R'), em virtude da associação com o indutor (I) que é, provavelmente, um produto derivado da lactose. O local de atuação do fator proteico CAP (3' 5' - AMP) é no promotor (p).

há muito conhecido, da repressão por catabólito^{2,7,50,57,72,73}. De fato, quando *E. coli* é crescida em meio rico em glicose, a presença de lactose não induz a síntese coordenada das enzimas β -galactosidase, permease e acetilase (ver Fig. 1). O mesmo ocorre com outros açúcares incapazes de induzir as enzimas responsáveis pelo seu metabolismo, na presença de glicose. O crescimento em presença de glicose provavelmente inibe a adenil-ciclase, enzima responsável pela conversão de ATP em 3'-5' AMP cíclico⁵³. A falta desse nucleotídeo não permitiria a ligação eficiente de fatores proteicos estimulatórios (p. ex. CAP) com o sítio promotor.

Do que foi dito, depreende-se que o controle da transcrição, em bactérias, se dá por dois mecanismos básicos: o controle negativo, que funciona ao nível do operador, basicamente inibitório, e o controle positivo, basicamente estimulatório, operando, provavelmente, ao nível do promotor. Entretanto, para se compreender melhor o processo da transcrição é necessário que se discutam algumas características da RNA polimerase.

RNA polimerase — A RNA polimerase, de *Escherichia coli*, foi a primeira enzima a ser extensivamente purificada, apresentando homogeneidade pelo critério da eletroforese em gel de poliácridamida, após tratamento com dodecil sulfato de sódio⁸. Embora a enzima de *Azotobacter vinelandii* também tenha sido bastante purificada^{4,5}, a maior parte dos estudos foi feita com a enzima de *E. coli*. Essa enzima possui 4 subunidades principais que foram chamadas de β' , β , σ , α com pesos moleculares de 155.000-165.000, 145.000-155.000, 85.000-90.000 e 39.000-41.000, respectivamente, estimados através de eletroforese em gel de poliácridamida⁹. Na maior parte das preparações dessa enzima, os mesmos autores identificam uma quinta subunidade, denominada ω de peso molecular 10.000. Discute-se se essa subunidade seria um componente funcional da enzima^{1,7}, embora a adenilação da RNA polimerase de *Bacillus subtilis*^{2,0}, provavelmente em ω , (Torres, comun. pessoal), torne a enzima inativa. A presença de ω na enzima de *E. coli* foi confirmada por Berg & Chamberlin⁶.

Existem duas formas ativas da enzima que foram bem estudadas, a holoenzima, que é a enzima completa contendo todas as subunidades, e a "core" polimerase, que não possui a subunidade σ . A remoção de σ da holoenzima pode ser feita por cromatografia em colunas de fosfocelulose⁹. Ambas as formas são ativas na cópia de polímero sintético poli dAT e de DNA fragmentado, mas somente a holoenzima transcreve com eficiência DNA intacto de fago T₄, por exemplo^{3,5}. Estudos da composição quanto às subunidades sugerem, portanto, a composição $\alpha_2, \beta', \beta, \sigma, (\omega_2)$ para a holoenzima⁶.

Fases da síntese de RNA — A síntese de RNA *in vitro*, catalisada por preparações puras de RNA polimerase, pode ser dividida em 4 fases distintas: ligação com o "template", iniciação da cadeia de RNA, alongamento e terminação. O estudo detalhado de cada uma dessas fases é de extrema importância,

pois o controle da iniciação e da terminação da síntese de RNA é essencial ao controle da expressão gênica. Nesse caso, outra pergunta importante pode ser feita: de que modo a enzima é capaz de selecionar, com fidelidade, sítios de iniciação e terminação?

(a) *Ligação com o "template"*

Na ausência de nucleosídeos-trifosfato, tanto a holoenzima como a "core" polimerase têm capacidade de ligar-se a poliânions, dos quais o DNA é aquele que nos interessa. Como a pH 7,0 a enzima está negativamente carregada, é imperativo concluir que ela deva ter, em partes de sua superfície, regiões positivamente carregadas para que ela se ligue no "template". Estudos feitos com as subunidades separadas demonstraram que somente a subunidade β' é capaz de ligar-se eficientemente ao DNA nativo segundo Sethi (citado por Burgess¹⁰). Isso leva à conclusão de que β' é a subunidade responsável pela ligação com o DNA. Entretanto, a "core" polimerase tem uma capacidade fraca de associação *in vitro* com o DNA, havendo a necessidade de σ e de temperatura acima de 20°C para que o complexo adquira baixa constante de dissociação^{3,36,76}. É sabido que a RNA polimerase completa (holoenzima) é capaz de catalisar o processo transcricional *in vitro* de forma assimétrica, isto é, copiando apenas uma das cadeias do DNA nativo^{2,9,31,59} e assemelhando-se, portanto, ao que ocorre *in vivo*^{54,68}. Ainda mais, usando-se como "template" DNA de diversos vírus^{2,9,59}, obtém-se transcrição apenas dos genes primários ("early" genes), isto é, dos genes que são transcritos no início da infecção, quando se estudam sistemas *in vivo*. A "core" polimerase, por outro lado, copia DNAs "template" de modo simétrico (com as duas cadeias copiadas igualmente) e não reconhece pontos de iniciação específicos^{4,33,65,67}. Levando-se em consideração que inúmeras regiões do DNA têm carga negativa e seriam, portanto, sítios potenciais de ligação, é de se supor que a enzima colida com tais sítios até encontrar uma região onde o complexo formado é de baixa constante de dissociação. Essa região seria um promotor, a partir do qual ter-se-ia uma correta iniciação da leitura. Os experimentos sugerem, fortemente, a necessidade de σ para uma correta iniciação e para estabelecer um complexo estável. Nas concentrações normais de reagentes, a ligação da enzima com o DNA se completa em alguns segundos.

O papel de σ — Como foi dito acima, a "core" polimerase contém o sítio catalítico para a síntese de RNA, mas sua capacidade de transcrever DNA intacto de bacteriófago é muito pequena. Por outro lado, σ não possui atividade catalítica, mas tem grande afinidade pela "core" polimerase à qual se liga em quantidades estequiométricas, reformando a holoenzima que é ativa na transcrição de genoma de bacteriófagos^{1,12,37,69}. O estímulo da transcrição, obtida com σ , se dá em virtude do aumento no número de cadeias iniciadas e não do aumento na velocidade de alongamento da cadeia^{11,69}. Além disso, a ação de σ é catalítica, sendo liberado da holoenzima logo após a iniciação da cadeia e subse-

quentemente reaproveitado por outra molécula de polimerase, promovendo o início de nova cadeia de RNA^{5,12,45}. A dissociação de σ da holoenzima parece ser promovida pela presença do RNA formado^{44,45}, conclusão essa reforçada pelo fato de que polinucleotídeos monocatenários ("single-stranded") promovem a dissociação *in vitro*¹⁰. A figura 2 esquematiza o ciclo de σ durante a transcrição^{6,9}.

Como a RNA polimerase (holoenzima) de *Escherichia coli* é capaz de transcrever com fidelidade e assimetricamente não apenas DNAs de bacteriófagos espécie-específicos, mas também DNAs de bacteriófagos de outras espécies bacterianas³¹ e de vírus animais^{75,32,42}, pode-se dizer que o não só está intimamente envolvido no reconhecimento de sítios promotores específicos, mas também que tais sítios, ou porções deles, foram mantidos relativamente constantes durante a evolução. Considerando-se que,

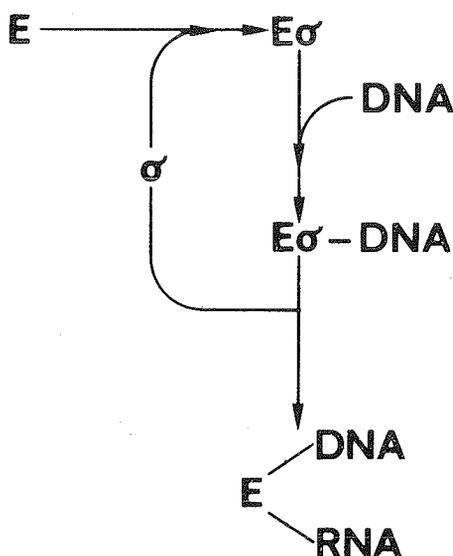


Figura 2 — Ciclo de σ durante a transcrição. Calcula-se que seja reutilizado 5 vezes em média.

nem σ , nem a "core" polimerase se ligam eficientemente ao DNA, admite-se que, de alguma forma, ambas contribuem para a formação de complexo DNA enzima de baixa constante de dissociação.

(b) Iniciação

A iniciação do processo transcrito é definida pela ligação orientada de dois nucleosídeos-trifosfato à enzima, pela eliminação da pirofosfato, formando-se um dinucleosídeo-tetrafosfato. No caso de DNAs nativos de bacteriófagos, que são os "templates" mais estudados até o momento, o nucleosídeo-trifosfato da extremidade 5' (inicial) é predominantemente ATP ou GTP⁵². Exemplificando, se a transcrição de uma determinada cadeia se inicia por ATP, seguida da adição de GTP, formar-se-á um dinucleosídeo-tetrafosfato que pode ser escrito como pppApC. A iniciação é bloqueada pelo antibiótico rifamicina que se liga especificamente à subunidade β da RNA polimerase. A droga não impede a ligação da enzima aos sítios promotores do DNA¹⁷. Com a holoenzima, a iniciação *in vitro* demora de 1 a 2 minutos.

(c) Alongamento

A adição de nucleosídeos-monofosfato à extremidade de 3' da cadeia nascente de RNA é definida como alongamento. Vários autores^{7,25,55} obtiveram velocidades de alongamento *in vitro* comparáveis às de transcrição *in vivo*. Cassani & col.¹⁶ demonstram que o antibiótico estreptolidigina bloqueia o processo de alongamento, ligando-se à enzima e não ao DNA "template". Como foi discutido anteriormente, em algum ponto durante o processo de alongamento σ se libera da holoenzima e a "core" polimerase continua o processo transcrito. O crescimento da cadeia é rápido, estimando-se a velocidade de leitura de 40 a 100 nucleotídeos por segundo¹⁷.

(d) Terminação

Os processos que levam à terminação e liberação da cadeia de RNA transcrita não são perfeitamente entendidos. Entretanto, o trabalho desenvolvido com DNAs de bacteriófagos permitiu o equacionamento de várias possibilidades que estão sendo ativamente experimentadas. Parecem ser duas as maneiras principais pelas quais ocorre o processo de terminação: a) terminação induzida por uma seqüência de nucleotídeos no DNA "template"; e b) terminação induzida por ρ .

Siegel & Summers⁶² demonstraram que, quando uma célula de *Escherichia coli* é infectada pelo bacteriófago T₇, apenas 4 espécies de RNA são transcritas do genoma do fago pela RNA polimerase bacteriana ("early genes" ou genes primários). As quatro espécies de RNA, quando analisadas, apresentaram os seguintes pesos moleculares: 1,1 x 10⁶, 0,45 x 10⁶, 0,29 x 10⁶ e 0,20 x 10⁶. É preciso notar que esses estudos foram feitos em presença de cloranfenicol durante a infecção, com a finalidade explícita de inibir a síntese proteica pelos ribossomos bacterianos. Chamberlin & col.¹⁸ demonstraram que, logo no início da infecção, forma-se uma nova RNA polimerase codificada pelo genoma do fago, que será a responsável pela transcrição dos genes "tardios". Essa nomenclatura é usada para distinguir os transcritos, sintetizados no início da infecção que não dependem de síntese proteica bacteriana (primários ou "early"), daqueles que dependem da síntese proteica (tardios ou "late") e, portanto, que não aparecem quando a infecção é feita em presença de cloranfenicol. É forçoso concluir que um dos transcritos observados por Siegel & Summers⁶² seja o mRNA responsável pela síntese da RNA polimerase específica do fago. Em consequência, o DNA de T₇ deve ter pelo menos duas classes de promotores, uma para os genes primários e outra para os genes tardios.

O uso de DNA de bacteriófago T₇ *in vitro*, como "template" da RNA polimerase bacteriana, fornece um RNA único, de peso molecular de 2,2 x 10⁶, que é aproximadamente a soma dos pesos moleculares das quatro espécies de RNA sintetizadas *in vivo*, após infecção da bactéria com fago T₇. Esse fato, juntamente com outras evidências circunstanciais, leva à hipótese de que o DNA em questão possua sinais de terminação da trans-

crição que são reconhecidos pela RNA polimerase que, por sua vez, seria liberada do "template" após atingi-los^{5,5}. Estudos similares com DNA de fago fd (forma replicativa), ϕ 80 e T₄ levaram à mesma conclusão^{5,2,5,5,6,7}.

Roberts^{6,0} isolou, de *E. coli* não infectada, uma proteína que, adicionada a um sistema de transcrição *in vitro*, é capaz de estancar o processo. Essa proteína, denominada ρ , não é uma nuclease, tem peso molecular de aproximadamente 200.000 e é um tetrâmero. Embora, atualmente, se discuta o local exato da atuação de ρ ^{4,7}, estudos recentes demonstram que ρ é capaz de reconhecer sinais específicos do DNA que não são os sinais de terminação acima descritos. A presença de ρ , no sistema *in vitro*, faz liberar cadeias curtas de RNA, mas não permite a liberação da RNA polimerase do "template"^{1,7,3,0,6,1}.

Esses resultados sugerem que, possivelmente, as quatro frações de RNA de Siegel & Summers^{6,2}, obtidas *in vivo*, tenham sido produzidas pela ação de ρ sobre sinais de reconhecimento específico (tentativamente três), antes que a RNA polimerase atingisse o sinal de terminação nucleotídico não depende de ρ , que demarcaria o fim da seqüência de de genes primários ("early").

Essas conclusões são especulativas, mas tudo leva a supor que DNAs de bacteriófagos (e possivelmente bactérias) possuam alguns sinais de terminação que são reconhecidos pela RNA polimerase e que estariam no final de grandes unidades transcritivas, e locais de ligação com fatores proteicos (ρ , por exemplo), que serviriam para o reconhecimento específico de unidades genéticas menores, incluídas na unidade transcricional maior. Szybalski & col.^{6,6} propuseram um novo termo, que ainda não caiu em uso comum, para definir essa situação. Para esses autores, uma unidade transcritiva que inclua diversos operons, mas que possua um promotor único, chamar-se-á *transcripton* ou *escripton*. O *transcripton* pode conter vários locais de controle positivo e negativo, de tal modo que a expressão de seus vários operons não necessite ser totalmente coordenada. Embora os autores tivessem proposto o termo para o caso específico de fago λ , sem fazer correlações mais gerais, vale a pena mencioná-lo.

O fator Psi (ψ) — Quando *E. coli* cresce rapidamente, 40% do RNA sintetizado é RNA ribossômico. Entretanto, numa reação *in vitro*, usando-se DNA de *E. coli* como "template" e RNA polimerase, menos de 0,2% do RNA sintetizado é RNA ribossômico^{4,3,5,8,7,0}. Esse fato indica que a iniciação da transcrição *in vivo* é eficiente, mas sugere, também, não ser propriedade da enzima iniciar a transcrição *in vitro* dessa classe particular de genes. Esse raciocínio levou Travers & col.^{7,0} a proporem a existência de um fator, à semelhança do fator CAP já discutido, que eles denominaram ψ . Além disso, os autores sugeriram que a transcrição diferencial, de diferentes classes de genes durante o desenvolvimento, seria desencadeada por fatores do tipo ψ

(CAP incluído), que seriam fatores secundários de regulação positiva, reconhecendo promotores específicos. Esse fator, que foi encontrado em extratos bacterianos após remoção de todos os elementos particulados da célula, de fato estimula a síntese *in vitro* de RNA ribossômico que, nesse caso, representa 30-40% do RNA sintetizado.

A restrição de aminoácidos a determinadas cepas de *E. coli* ("stringent") resulta em inibição da síntese de espécies estáveis de RNA (RNAs ribossômicos e de transferência), preferencialmente^{2,8,5,6}. Um evento paralelo a esse fenômeno é o acúmulo rápido de guanosina tetrafosfato ppGpp^{1,3,1,5}, que poderia, então, ser inibidor da síntese de RNA ribossômico^{1,4}.

Travers & col.^{7,0} experimentaram o efeito de ppGpp na síntese *in vitro* de RNA ribossômico, estimulada por fator ψ , e o resultado inibitório foi de 50-65% em relação ao controle, enquanto a inibição por ppGpp, da mesma atividade transcricional pela holoenzima na ausência de ψ , foi de apenas 10%. Esses resultados indicam a similaridade entre os fatores CAP e ψ .

A existência do fator ψ tem sido contestada, entretanto, pela observação de Travers* de que o aumento da concentração de mercaptoetanol de 10⁻³ M a 10⁻² M no meio de reação estimula a síntese de RNA ribossômico *in vitro*, na ausência de ψ . Pelos recentes trabalhos de Haseltine^{3,4} e Hussey & Losick^{3,8}, utilizando condições mais rigorosas de hibridização, foram obtidos resultados próximos aos de Travers, sem utilização de ψ .

É nossa opinião que, como no caso de CAP, muito operons funcionem desse modo, pois σ não seria suficiente para o reconhecimento específico de operadores. A existência de fatores proteicos (associados ou não a nucleotídeos), que serviriam como elementos secundários específicos de controle positivo, impõe-se como uma dedução lógica^{6,5,6,9,7,0}.

Nesse sentido, torna-se interessante o estudo do mecanismo de esporulação em bactérias do gênero *Bacillus*. De fato, demonstrou-se^{4,9} que a RNA polimerase de *B. subtilis*, em fase vegetativa de crescimento, é capaz de transcrever, *in vitro*, DNA sintético (poli dAT) e DNA de fago ϕ e. O fago ϕ e é um vírus de *Bacillus subtilis* que consegue infectá-lo somente na fase vegetativa de crescimento, mas é incapaz disso quando a célula bacteriana está comprometida com a esporulação. A RNA polimerase extraída de *B. subtilis* em esporulação é incapaz de transcrever DNA de fago ϕ e, mas transcreve poli dAT.

Nesse caso, deve-se concluir que, durante a diferenciação da célula bacteriana para esporo, ocorre uma mudança de especificidade da RNA polimerase pelo substrato. De fato, diferenças na subunidade β e σ foram detectadas entre enzimas extraídas nos dois estágios citados do ciclo de crescimento dessa bactéria^{4,8,5,1}. Esses dados ficam mais interessantes quando se sabe que, durante a esporulação, há uma parada de síntese de RNA

*Comunicação no Intern. Symp. Prot. Synthesis and Nucl. Acids, La Plata, Argentina, 1971.

ribossômico^{3,9}.

Considerando-se que durante os primeiros 10 minutos na germinação do esporo, o RNA sintetizado é, na maior parte, formado de espécies estáveis - rRNA e tRNA², seria interessante saber que RNA polimerase está transcrevendo esses genes, pois a enzima presente no esporo em germinação não deveria sintetizar rRNA, tendo-se em conta que, nesse período, não há síntese proteica. Uma das possibilidades seria a ativação de um fator proteico qualquer, presente no esporo, por modificações introduzidas no meio de cultura, conferindo especificidade de ligação à polimerase pelos promotores que controlam os genes responsáveis pela síntese de RNAs estáveis. A descoberta de tal fator poderia ser facilitada por resultados recentes que demonstram ser possível isolar genes para RNA ribossômico em razoável estado de pureza^{21,22}.

Agradecimentos

O autor agradece o interesse de J.C.C. Maia, B.Z.O. Nascimento e N. de Castro, que fizeram valiosas sugestões para a redação desse trabalho. Os desenhos foram feitos por Hiroshi Aoyama, a quem agradecemos.

Referências Bibliográficas

- ARDITTI, R.R.; ERON, L.; ZUBAY, G.; TOCCHINI-VALENTINI, G.; CONNAWAY, S. & BECKWITH, J. — *In vitro* transcription of the lac operon genes. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 437-442, 1970.
- ARMSTRONG, R. L. & SUEOKA, N. — Phase transitions in ribonucleic acid synthesis during germinations of *Bacillus subtilis* spores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 59: 153-160, 1968.
- BAUTZ, E. K. F. & BAUTZ, F.A. — Studies on the function of the RNA polymerase σ factor in promoter selection. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 227-232, 1970.
- BAUTZ, E. K. F., BAUTZ, F. A. & DUNN, J. J. *E. coli* σ factor: a positive control element in phage T₄ development. *Nature*, 223: 1022-1024, 1969.
- BERG, D., BARRET, K.; HINKLE, D.; McGRATH, J. & CHAMBERLIN, M. — A sub-unit of RNA polymerase involved in chain initiation. *Fed. Proc.*, 28: 659, 1969.
- BERG, D. & CHAMBERLIN, M. — Physical studies on ribonucleic acid polymerase from *E. coli* B. *Biochemistry*, 9: 5055-5064, 1970.
- BREMER, H. — Influence of KCl on the *in vitro* transcription of T₄ DNA. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 109-119, 1970.
- BURGESS, R. R. — A new method for the large scale purification of *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.*, 244: 6160-6167, 1969a.
- BURGESS, R. R. — Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.*, 244: 6168-6176, 1969b.
- BURGESS, R. R. — RNA Polymerase. *Ann. Rev. Biochem.*, 40: 711-740, 1971.
- BURGESS, R. R. & TRAVERS, A. A. — *Escherichia coli* RNA polymerase: purification, sub-unit structure, and factor requirements. *Fed. Proc.*, 29: 1164-1169, 1970.
- BURGESS, R. R.; TRAVERS, A. A.; DUNN, J. J. & BAUTZ, E. K. F. — Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*, 221: 43-46, 1969.
- CASHEL, M. — The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid-starved stringent strains. *J. Biol. Chem.*, 244: 3133-3141, 1969.
- CASHEL, M. — Inhibition of RNA polymerase by ppGpp, a nucleotide accumulated during the stringent response to amino acid starvation in *E. coli*. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 407-413, 1970.
- CASHEL, M. & GALLANT, J. — The control of RNA synthesis in *Escherichia coli*. I. Amino acid dependence of the syntheses of the substrates of RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 34: 317-330, 1968.
- CASSANI, G.; BURGESS, R. R. & GOODMAN, H. M. Streptolydigin inhibition of RNA polymerase. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 59-63, 1970.
- CHAMBERLIN, M. — Transcription 1970: A summary. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 851-873, 1970.
- CHAMBERLIN, M.; McGRATH, S. & WASKELL, L. Isolation and characterization of a new RNA polymerase from *E. coli* infected with bacteriophage T₇. *Nature*, 228: 227-231, 1970.
- CHAMBERS, D. A. & ZUBAY, G. — The stimulatory effect of cyclic adenosine 3', 5' — monophosphate on DNA — directed synthesis of β -galactosidase in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 63: 118-122, 1969.
- CHELALA, C. A.; HIRSCHBEIN, L. & TORRES, H. N. Interconvertible forms of *E. coli* polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 68: 152-154, 1971.
- COLLI, W. — Genes redundantes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico em *Bacillus subtilis*: I. Relações topológicas no cromossomo; II. Purificação sob a forma de híbridos DNA-RNA. Tese de Livre-Docência. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 1971.
- COLLI, W. & OISHI, M. — A procedure for gene purification: the purification of the ribosomal RNA genes of *Bacillus subtilis* as DNA-RNA hybrids. *J. Mol. Biol.*, 51: 657-669, 1970.
- CORY, S.; SPAHR, P. F. & ADAMS, J. M. — Untranslated nucleotide sequences in R17 bacteriophage RNA. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 1-12, 1970.
- DANIEL, V.; SARID, S. & LITTAUER, U. Z. Bacteriophage induced transfer RNA in *E. coli*. *Science*, 167: 1682-1688, 1970.
- DAVIS, R. W. & HYMAN, R. W. — Physical locations of the *in vitro* RNA initiation site and termination sites of T7M DNA. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 269-281, 1970.
- ENGLESBERG, E.; SHEPPARD, D.; SQUIRES, C. & MERONK, F. — The L-arabinose operon in *E. coli* B/r; a genetic demonstration of two functional states of the product of a regulator gene. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 62: 1100-1107, 1969.
- EPPS, H. M. R. & GALE, E. F. — The influence of the presence of glucose during growth on the enzymatic activities of *E. coli*: comparison of the effect with that produced by fermentation acids. *Biochem. J.*, 36: 619-623, 1942.
- GALLANT, J. & HARADA, B. — The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. III. The functional relationship between purine ribonucleoside. *J. Biol. Chem.*, 244: 3125-3132, 1969.
- GEIDUSCHEK, R. P. & HASELKORN, R. — Messenger RNA. *Ann. Rev. Biochem.*, 38: 647-676, 1969.
- GOLDBERG, A. R. — Termination of *in vitro* RNA synthesis by ρ factor. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 157-161, 1970.
- GRAU, O.; OHLSSON-WILHELM, B. M. & GEIDUS-

- CHEK, E. P. — Transcription specificity in bacteriophage SP01 development. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 221-226, 1970.
32. GREEN, M.; PARSONS, J. T.; PIÑA, M.; FUJINAGA, K.; CAFFIER, H. & LANDGRAF-LEURS, I. — Transcription of adenovirus genes in productivity infected and in transformed cells. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 803-818, 1970.
33. HALL, B. D.; HAGER, G.; FIELDS, K. L. & BEGUIN, F. — Transcription specificity of *E. coli* and T₄ RNA polymerase. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 51: 1397-1405, 1969.
34. HASELTINE, W. A. — "In vitro" transcription of *E. coli* ribosomal RNA genes. *Nature*, 235: 329-333, 1972.
35. HAYWARD, W. S. & GREEN, M. H. — Effect of the lambda repressor on the binding of RNA polymerase to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 64: 962-969, 1969.
36. HINKLE, D. C. & CHAMBERLIN, M. — The role of Sigma subunit in template site selection by *E. coli* RNA polymerase. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 65-72, 1970.
37. HIRSCHBEIN, L.; DUBERT, J. M. & BABINET, C. Structural and enzymatic properties of the *E. coli* RNA polymerase subunits. *FEBS Lett.*, 3: 260-262, 1969.
38. HUSSEY, C. & LOSICK, R. — In vitro synthesis of ribosomal RNA by *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 69: 407-411, 1972.
39. HUSSEY, C.; LOSICK, R. & SONENSHEIN, A. I. Ribosomal RNA synthesis is turned off during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. mol. Biol.*, 57: 59-70, 1971.
40. JACOB, F. & MONOD, J. — Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.*, 3: 318-356, 1961.
41. JEPPESEN, P. G. N.; NICHOLS, S. L.; SANGER, F. & BARREL, B. G. — Nucleotide sequences from bacteriophage R17 RNA. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 13-19, 1970.
42. KELLER, W. & GOOR, R. — Mammalian RNA polymerase: structural and functional properties. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 671-680, 1970.
43. KENNEL, D. — Titration of the gene sites on DNA by DNA-RNA hybridization. II. The *Escherichia coli* chromosome. *J. Mol. Biol.*, 34: 85-103, 1968.
44. KRAKOW, J. S. & FRONK, E. — *Azotobacter vinelandii* ribonucleic acid polymerase. VIII. Pyrophosphate exchange. *J. Biol. Chem.*, 244: 5988-5993, 1969.
45. KRAKOW, J. S. & VON DER HELM, K. — *Azotobacter* RNA polymerase transitions and the release of Sigma. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 73-83, 1970.
46. LARSEN, C. J.; LEBOWITZ, P.; WEISSMAN, S. M. & DUBUY, B. — Studies of the primary structure of low molecular weight ribonucleic acid other than tRNA. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 35-46, 1970.
47. LOSICK, R. — In vitro transcription. *Ann. Rev. Biochem.* 41: 409-446, 1972.
48. LOSICK, R.; SHORENSTEIN, R. G. & SONENSHEIN, A. L. — Structural alteration of RNA polymerase during sporulation. *Nature*, 227: 910-913, 1970.
49. LOSICK, R. & SONENSHEIN, A. L. — Change in the template specificity of RNA polymerase during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Nature*, 224: 35-37, 1969.
50. MAGASANIK, B. — Catabolite repression. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 26: 249-256, 1961.
51. MAIA, J. C. C.; KERJAN, P. & SZULMAJSTER, J. DNA dependent RNA polymerase from vegetative cells and from spores of *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.*, 13: 269-274, 1971.
52. MAITRA, U.; LOCKWOOD, A. M.; DUBNOFF, J. S. & GUHA, A. — Termination, release, and reinitiation of RNA chains from DNA templates by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 143-156, 1970.
53. MAKMAN, R. S. & SUTHERLAND, E. W. — Adenosine 3', 5' — phosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 240: 1309-1314, 1965.
54. MARMUR, J.; GREENSPAN, C.; PALACEK, F.; KAHAN, F. M.; LEVINE, J. & MANDEL, M. — Specificity of the complementary RNA formed by *Bacillus subtilis* infected with bacteriophage SP8. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28: 191-199, 1963.
55. MELLETTE, R. L.; TROTTER, C. D.; HERRLICH, P. & SCHWEIGER, M. — In vitro synthesis, termination, and release of active messenger RNA. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 135-142, 1970.
56. NEIDHART, F. C. & EIDLIC, L. — Characterization of the RNA formed under conditions of relaxed amino acid control in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 68: 380-388, 1963.
57. PERLMAN, R. L.; DE CROMBRUGGHE, B. & PASTAN I. — Cyclic AMP regulates catabolite and transient repression in *E. coli*. *Nature*, 223: 810-812, 1969.
58. PETTIJOHN, D. E.; CLARKSON, L.; KOSSMAN, C. R. & STONINGTEN, O. G. — Synthesis of ribosomal RNA on a protein-DNA complex isolated from bacteria: a comparison of ribosomal RNA synthesis in vitro and in vivo. *J. Mol. Biol.*, 52: 281-300, 1970.
59. RICHARDSON, J. P. — RNA polymerase and the control of RNA synthesis. *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, 75-96, 1969.
60. ROBERTS, J. W. — Termination factor for RNA synthesis. *Nature*, 224: 1168-1174, 1969.
61. ROBERTS, J. W. — The ρ Factor: Termination and Anti-Termination in Lambda. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 121-126, 1970.
62. SIEGEL, R. B. & SUMMERS, W. C. — The process of infection with coliphage T₇. III. Control of phage specific RNA synthesis in vivo by an early phage gene. *J. Mol. Biol.*, 49: 115-123, 1970.
63. SILVERSTONE, A.; ARDITTI, R. & MAGASANIK, B. — Altered catabolite sensitivity of *lac* promoter revertants. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 66: 773-779, 1970.
64. SMITH, D. W. & RUSSEL, N. L. — Transfer RNA synthesis, methylation and thiolation in *Escherichia coli* cells injected with phage T₂. *Biochem. Biophys. Acta*, 209: 171-182, 1970.
65. SUMMERS, W. C. & SIEGEL, R. B. — Control of template specificity of *E. coli* RNA polymerase by a phage coded protein. *Nature*, 223: 1111-1113, 1969.
66. SZYBALSKI, W.; BOVRE, K.; FIANDT, M.; HAYES, S.; HRADECNA, Z.; KUMAR, S.; LOZERON, H. A.; NIJKAMP, H. J. J. & STEVENS, W. F. — Transcriptional Units and their Controls in *Escherichia coli* Phage λ : Operon and Scripts. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 341-353, 1970.
67. TAKANAMI, M.; OKAMOTO, T. & SUGIURA, M. The starting nucleotide sequences and size of RNA transcribed in vitro on phage DNA templates. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 179-187, 1970.
68. TAYLOR, K.; HRADECNA, Z. & SZYBALSKI, W. Asymmetric distribution of the transcribing regions in the complementary strands of coliphage λ DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 57: 1618-1625, 1967.
69. TRAVES, A. A. & BURGESS, R. R. — Cyclic reuse of the RNA polymerase sigma factor. *Nature*, 222: 537-540, 1969.
70. TRAVERS, A. A.; KAMEN, R. I. & SCHLEIF, R. F. Factor necessary for ribosomal RNA synthesis. *Nature*, 228: 748-751, 1970.
71. TRAVERS, A. A.; KAMEN, R. I. & CASHEL, M. The in vitro synthesis of ribosomal RNA. *Cold Spr.*

- Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 415-418, 1970.
72. ULMANN, A. & MONOD, S. — Cyclic AMP as an antagonist of catabolite repression in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 2: 57, 1968.
73. VARMUS, H. E.; PERLMAN, R. L. & PASTAN, I. Regulation of *lac* messenger ribonucleic acid synthesis by cyclic adenosine 3' 5' — monophosphate and glucose. *J. Biol. Chem.*, 245: 2259-2267, 1970.
74. WATSON, J. D. — *Molecular Biology of the Gene*. Benjamin, 2nd. ed., p. 515, 1970.
75. WESTPHAL, H. & KIEHN, E. D. — The *in vitro* product of SV40 DNA transcription and its specific hybridization with DNA of SV40-transformed cells. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 819-821, 1970.
76. ZILLIG, W.; ZECHEL, K.; RABUSSAY, M.; SCHACHNER, M.; SETHI, V.S.; PALM, P.; HEIL, A. & SEIFERT, W. — On the role of different subunits of DNA-dependent RNA polymerase from *E. coli* in the transcription process. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 47-58, 1970.
77. ZUBAY, G.; SCHWARTZ, D. & BECKWITH, J. — The mechanism of activation of catabolite-sensitive genes. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 433-435, 1970.

Volume 3, Número 1 — Janeiro/Março, 1972

Artigos originais

Multiplication of <i>Rickettsia rickettsii</i> in primary cell cultures — E. de Rizzo, H.N. Tuchia, A. Brunner Jr., D.A. Portinari & C.M. Souza	1
Viabilidade de <i>Pasteurella pestis</i> em espécimes conservados no meio de Cary & Blair — I.D. Ricciardi, M.P. Nunes, L.A. Reis & I. Suassuna.	7
Characteristics of strains of <i>E. rhusiopathiae</i> isolated in Brazil — A.F. Pestana de Castro, L.R. Trabulsi, O. Campedelli Filho & C. Troise	11
Influência dos adubos minerais na atividade celulolítica em solos de cerrados — M.C. Dantas & A. Drozdowicz	25
Polysaccharide production by <i>Polyporus circinatus</i> Fr. — M.H. Pinotti & G.T. Zancan	35
Tipificação de amostras de <i>Brucella</i> isoladas no Estado de São Paulo, Brasil — W. Giorgi, A.F. Pestana de Castro & M.A.S.C. Portugal.	39

Notas

Formamidase activity in mycobacteria — M. Magalhães, G. Campos & T. Almeida	45
Influência dos ions Mn^{2+} e Mg^{2+} na esporulação endotrófica do <i>Bacillus licheniformis</i> — 2390 — L. Rabinovitch	47

Revisão

Antibiograma — H. Rocha, M.E. Zuliani & L.R. Trabulsi	51
---	----

Volume 3, Número 2 — Abril/Junho, 1972

Artigos originais

Análise microbiológica de ácido nicotínico e trigonelina em cafés brasileiros — E.N.S. de Oliveira, K. Kizawa & B. Campos	61
Tratamento de sementes de <i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> com antibióticos e sua ação em <i>Xanthomonas campestris</i> — M.A. Lemos, R.N. Neder & J.L. Azevedo	69
Occurrence of atypical mycobacteria in the lymph nodes of apparently healthy slaughtered cattle in São Paulo, Brazil — A.F.P. de Castro & H. Nemoto.	75
Dosagens microbiológicas de vitaminas em peixes e crustáceos — S. Ribeiro & I. Roitman.	79
Bacteriological study on atypical mycobacteria associated with man — M. Magalhães, G. Campos & T. Guerra.	85
Atividade celulolítica em alguns solos brasileiros — L.F. de T.L. Linhares & A. Drozdowicz.	91

Nota

Studies on a strain of <i>Listeria (L. grayi)</i> isolated from bovine nasal secretion — E. Hofer	101
---	-----

Revisão

Técnicas selecionadas de coloração e de citologia ótica de bactérias — I. Suassuna & I.R. Suassuna	103
--	-----

Volume 3, Número 3 — Julho/Setembro, 1972

Artigos originais

Search of B-1 aflatoxin and similar fluorescent compounds in Brazilian cassava-flour — Adhemar Purchio.	121
Estudo bacteriológico de infecções entéricas em crianças até 2 anos, no município de Araraquara, SP — Deise Pasetto Falcão	127
Método semi-quantitativo com alça bacteriológica calibrada para investigação epidemiológica da bacteriúria assintomática — N.J. Lourenço, L.B. Collares, P.A. Pabst, H. de A. Cordeiro, D.R. Guimarães, J.A. Gerk, S.J. Ferreira, J.F. de S. Oliveira, Alba L.S. Noletto & I. Suassuna.	139
Estudo da flora microfúngica de uma área mineralizada de cobre, em Maragipe, Est. da Bahia — Regina M. Ribeiro, Hebe Labarthe Martelli & Adelaide Mussi Santos	147

Nota

O método turbidimétrico na medida de concentração e de velocidades de reprodução de microrganismos — Walter Borzani	153
---	-----

Revisão

O ciclo parassexual em fungos — João Lúcio de Azevedo	157
---	-----

Artigos originais

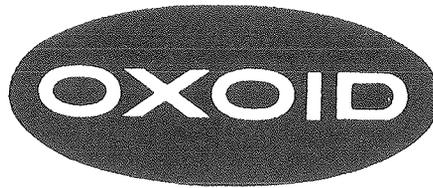
- T-strain of *Mycoplasma* in abacterial urethritis – Marcelo Magalhães, Adema Vêras & Luiz Numeriano. 169
- Análise microbiológica de colina em cafés brasileiros [*Microbiological assay for choline in Brazilian coffee*] Elma N. Suassuna de Oliveira, Betinha Campos & E.B. de Oliveira. 173
- Anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em soros de doadores de Sangue no Recife, detectados por imunofluorescência [*Antibodies against Toxoplasma gondii in sera of blood bank donors in Recife, detected by indirect immunofluorescence technique*] – Diva Montenegro, Vital Lira & Ester Azoubel 177
- Colonização de doentes hospitalizados por *Staphylococcus aureus* e bactérias gram-negativas [*Colonization of hospitalized patients by Staphylococcus aureus and gram-negative bacteria*] – Rudolf Uri Hutzler, Luiz Rachid Trabulsi & Guilherme Rodrigues da Silva. 179

Revisão

- Transcrição gênica em bactérias [*Gene transcription in bacteria*] – Walter Colli 191



COLUMBIA AGAR BASE



Uma nova base para agar-sangue

Columbia Agar Base OXOID combina as propriedades das bases tradicionais apresentando acentuada melhoria de rendimento em geral.

D. S. T. AGAR BASE

- seguramente o mais indicado para antibiogramas
- não impede a difusão de antibióticos, sulfonamidas e antissépticos urinários.

**SOLICITEM-NOS
LITERATURA
CONSULTEM-NOS
SEMPRE**

MULTODISCOS PARA ANTIBIOGRAMAS

- seleção racional dos agentes
- práticos e econômicos

Distribuidora exclusiva:



Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos

Rua Barata Ribeiro, 369 — Caixa Postal 4022
Fones: 256-0508 / 256-1682 / 256-9848 / 257-1831
SÃO PAULO — SP