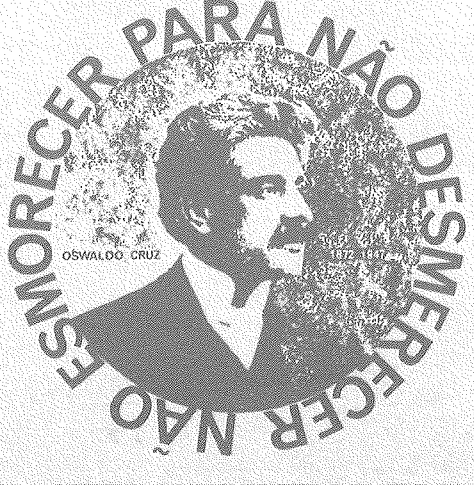
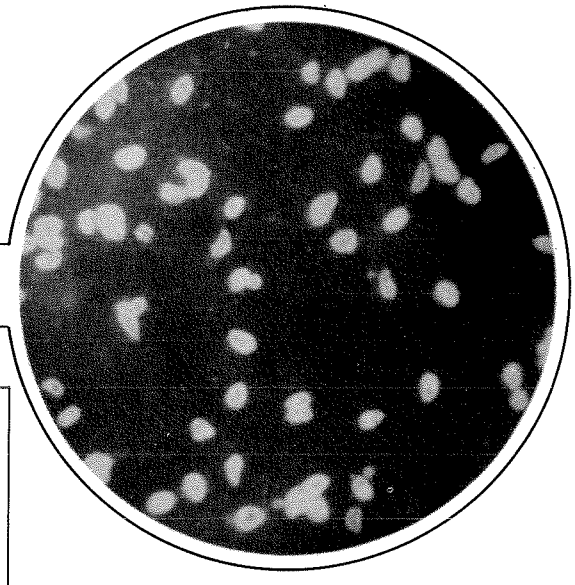
Volume 4 Número 2 Abr.-Jun. 1973

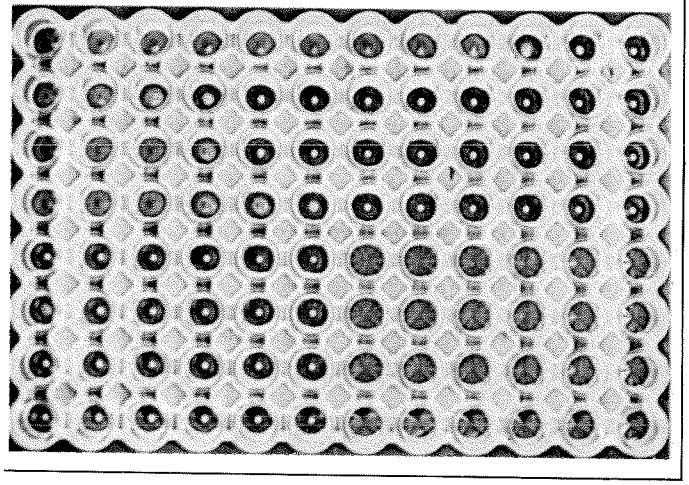
Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo – Brasil



Da imunofluorescência

à aglutinação direta





Após a promoção do primeiro reagente para imunofluorescência, B-D MÉRIEUX inova hoje com um antígeno para aglutinação direta. Este novo método permite, pela sua simplicidade, uma despistagem mais ampla da afeção, e, associado à imunofluorescência, conduz a um diagnóstico mais completo e seguro, pelas informações complementares sobre a evolução da doença.

B-D MÉRIEUX

é o primeiro no diagnóstico da TOXOPLASMOSE

IMUNOFLUORESCÊNCIA

- Antígeno Toxoplásmico liofilizado
- Soro positivo de controle
- Tampão P B S
- Globulina anti-humana marcada pela fluoresceína
- Lâminas p/imunofluorescência

AGLUTINAÇÃO DIRETA

- Suspensão de Toxoplasmas
- Soro positivo de controle
- Tampão B A B S
- Placa descartável p/microtitulação
- Micropipeta

Documentação científica completa sob pedido

BIOLAB-MÉRIEUX-PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA.

RUA DO RESENDE, 96-A - GR. 201 e 202 - TELS. 221-4089/242-0050 - ZC-06 20000 RIO DE JANEIRO GB
AVENIDA CASPER LÍBERO, 58 - GRUPO 1603 - TELEFONE 32-3655 01033 SÃO PAULO SP
AVENIDA W-3 - EDIFÍCIO JOSÉ SEVERO - SL. 5 - TELEFONE 24-5711 70000 BRASÍLIA DF
RUA VIGÁRIO JOSÉ INÁCIO, 399/902 - TELEFONE 25-5677 90000 PORTO ALEGRE RS
AV. AMARAL PEIXOTO, 207-ED. ALBERT SABIN-GR. 706-TELEFONE 722-0411 24000 NITERÓI RJ
PRAÇA DO DERBY, 201 - TELEFONE 22-4755 50000 RECIFE PE

Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo – Brasil

Conselho Editorial Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo

Editor João Salvador Furtado
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Editores Associados Antônio F. Pestana de Castro e Sílvio A. C. Camba

Aquisição por não-membros Assinatura anual para quatro números: Cr$ 100,00 para o Brasil; US$ 15.00 (via marítima) ou US$ 20.00 (via aérea) para o Exterior. Números avulsos: Cr$ 25,00 para o Brasil e US$ 5.00 (via aérea) ou US$ 4.50 (via marítima) para o Exterior. Cheques ou ordens de pagamento em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Editor.

Aquisition by non-members Annual subscription for four numbers: US$ 15.00 (surface mail) or US$ 20.00 (air mail). Single copies: US$ 5.00 (air mail) or US$ 4.50 (surface mail). Checks or money orders for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Editor's office.

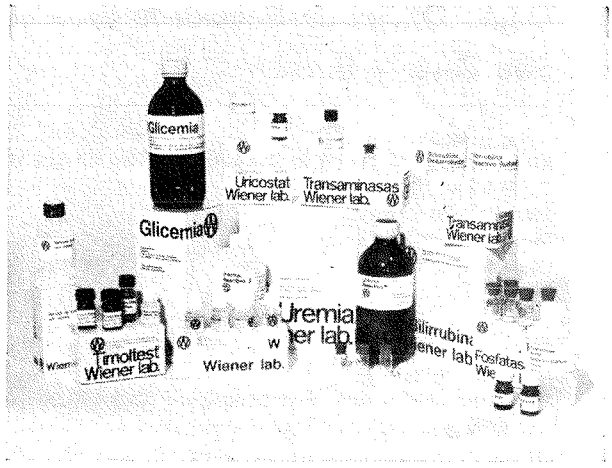
Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria Luiz Rachid Trabulsi, Presidente. Laerte M. de Andrade, Vice Presidente. Wilson Chagas de Araujo, Secretário Geral. João S. Furtado, Tesoureiro.

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 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.

Delegados Regionais ALAGOAS: Ayro Pontes Lima Bomfim (Maceió). AMAZONAS: Aurélia Lopes Castrillon (Manaus). BAHIA: Carlos Brenha Chaves (Salvador). CEARÁ: Eldair dos Santos Sátiro (Fortaleza). ESPÍRITO SANTO: Henrique Tommasi Netto (Vitória). GÓIAS: Maria Aparecida Muniz (Goiânia). GUANABARA: Altair Antunes Zebral (Rio de Janeiro) e Milton de Uzeda (Rio de Janeiro). MARANHÃO: Salomão Fiquene (São Luiz). MINAS GERAIS: Romain Rolland Golgher (Belo Horizonte). PARÁ: Zéa Constante Lins (Belém). PARAÍBA: Maria Marluce Melo Vasconcelos de Castro (João Pessoa). PARANÁ: Alceu Schwab (Curitiba) e Luiz Parelha Ruiz (Londrina). PERNAMBUCO: Diva Montenegro Melo de Azevedo (Recife) e Marcelo Magalhães (Recife). RIO GRANDE DO NORTE: Maria Raquel dos Santos (Natal). RIO GRANDE DO SUL: Sérgio Job Jobim (Porto Alegre), Newton Neves da Silva (Porto Alegre) e Tabajara Gaúcho da Costa (Santa Maria). RIO DE JANEIRO: Cláudio Armando Jürgensen (Niterói). SANTA CATARINA: Aquilles A.Cordova Santos (Florianópolis). SÃO PAULO: Deise Pasetto Falcão (Araraquara). Vicente Correa Miranda (Araraquara), Augusto Cezar Montelli (Botucatu), Izabel Yoko Ito (Ribeirão Preto), Antônio Walter Ferreira (São Paulo), Waldyr Giorgi (São Paulo), Gil V. A. Pessoa (São Paulo) e Edécio Maluf (Sorocaba). SERGIPE: Raimundo Mendonça de Araujo (Aracaju).

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 4 Abril-Junho 1973 Número 2

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 4(2)

CONTEÚDO – CONTENTS

Artigos originais

Estudo de algumas características fisiológicas de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos brasileiros [*Some physiological aspects of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian soils*] – Hélio Peixoto de Azevedo 21

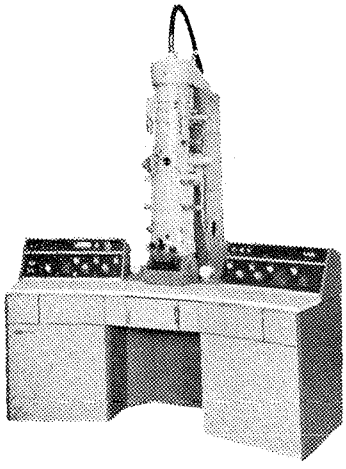
Sensibilidade de bactérias gram-negativas da flora urinária a antibióticos: comparação entre germes isolados em hospital geral e em clínica privada [*Sensitivity of gram-negative bacteria from urinary flora to antibiotics: a comparison between germs isolated in general hospital and a private clinic*] – Moema Magnavita G. Oliveira, Milton Barros, Facelucia Barros & Heonir Rocha 27

Epidemiologia e diagnóstico laboratorial de *Trichomonas vaginalis* [*Epidemiology and laboratory diagnostic of Trichomonas vaginalis*] – Geraldo A. De Carli & Beatriz Machado 33

Estudo preliminar das propriedades antifúngicas por bacilos saprófitas do ar e solo [*Preliminary study of antifungal properties by two saprophyte bacilli from the air and soil*] – C.M.F.S. Serôdio, J.C. Calleya, L.M.H. Sousa & R. Boelter 37

JEOL

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

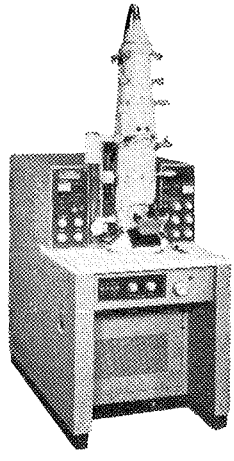


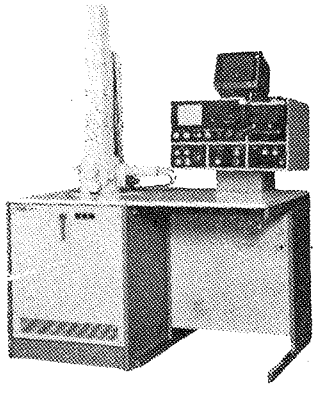
Microscópio Eletrônico JEM-100B

- 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 (mμ) e micromico ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm; 10^{-6}m), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm; 10^{-9}m), ao invés de milimicro (mμ); e Angstroms (A; 10^{-10}m). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microgramos por mililitros (μg/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 secção **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 secção 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.

INTER LAB

Rua Dom Duarte Leopoldo, 707 — Telefone: 278-9703
Caixa postal 15 192 — Correio Cambuci
São Paulo SP

Distribuidores autorizados para o Brasil de:

DIFCO LABORATORIES (Estados Unidos)
Pioneira mundial em bacteriologia

aminoácidos; anticorpos fluorescentes; antígenos e antissoros bacterianos; carboidratos; corantes; discos para antibiogramas e para diferenciação de peptonas; endotoxinas; enriquecedores; enzimas; indicadores; hidrolisados; meios de cultura desidratados e preparados para ensaios microbiológicos, métodos padrões, tecidos e vírus; produtos bioquímicos; reativos sorológicos e clínicos.

DIFCO LABORATORIES (Inglaterra)
A mesma qualidade Difco em produtos especializados

- *produtos selecionados para microscopia óptica:* bálsamo do Canadá, Carbowax, corantes (Giemsa, hematoxilina, May-Grunwald, Papanicolau e uma linha completa de corantes em pó e em solução), clarificadores, DPX, fixadores, indicadores, material para montagem e vedação de lâminas, mordentes, óleo para imersão, parafina histológica, Polywax e outros produtos;
- *materiais fixadores e para montagem em microscopia eletrônica;*
- *produtos químicos diversos.*

PROPPER INTERNATIONAL (Estados Unidos)
Precisão e qualidade garantidas

câmaras de Neubauer; lâminas e lamínulas; lancetas; pipetas para contagem de glóbulos brancos e vermelhos; pipetas de Sahli; termômetros químicos; torniquetes; tubos capilares com e sem heparina.

LABTEST (Brasil)
Colorimetria avançada para análises químicas

ácido úrico; amilase; anticoagulantes; bilirrubina; cálcio; colesterol; cloretos; corantes para hematologia e eletroforese; creatinina; dehidrogenase láctica; ferro sérico; fosfatase ácida prostática; fosfatase alcalina; fósforo; glicose; lípides totais; proteínas totais e albumina; timol; transaminases; triglicérides; uréia.

IVA — INDUSTRIA VIDRIERA ARGENTINA (Argentina) Última qualidade a preços sem concorrência

vidro de borosilicato, trabalhado com esmero: balões, buretas, Erlcnmeyers, pipetas, provetas.

ROLCO SRL — Qualidade a preço inigualável

agitadores; butirômetros; centrífugas clínicas e industriais; destiladores de água; microhematocritos.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Sócios Patrocinadores

BIOLAB-MÉRIEUX – Produtos 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.

Pfizer Química Ltda.

Estudo de algumas características fisiológicas de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos brasileiros*

Hélio Peixoto de Azevedo**

Resumo

Foram estudadas algumas características fisiológicas de seis amostras de bactérias fixadoras assimbióticas de nitrogênio atmosférico, isoladas de solos brasileiros. As amostras estudadas variaram em comportamento quanto à utilização de compostos de carbono e nitrogênio, bem como a outras propriedades. A capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico foi variável, atingindo até 27 mgN_2/g de glicose consumida. Tendo em vista as características das amostras em cultura e a fixação de nitrogênio observada, as amostras foram tentativamente classificadas como pertencentes ao gênero *Derxia*. Algumas características, no entanto, as aproximaram ao gênero *Beijerinckia*.

Summary

Some physiological aspects of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian soils

Several physiological characteristics of six strains of asymbiotic nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian soils were studied. The strains behaved differently in their features of carbon and nitrogen source utilization. Their ability to fix nitrogen was variable with values as high as 27 mgN_2/g of consumed glucose. According to their culture characteristics and the N_2-fixation efficiency the strains were tentatively classified into the genus *Derxia*. Some characteristics, however, tend to relate them to *Beijerinckia*.

Introdução

Entre os microrganismos capazes de fixar nitrogênio elementar, existe o grupo de fixadores facultativos os quais usualmente crescem abundantemente em meios contendo fontes de nitrogênio combinado, e, lentamente, em meios sem a adição destas fontes. Em meios desprovidos de nitrogênio combinado, os fixadores facultativos fixam quantidades variáveis de nitrogênio, em geral inferiores a 20 mg N_2 por grama de fonte de carbono consumida. Tal é o caso de bactérias dos gêneros *Azotobacter* e *Beijerinckia*. Em 1960, Jensen & col.[10] descreveram uma nova bactéria, que denominaram *Derxia gummosa*, a qual crescia igualmente bem com nitrogênio livre ou combinado, tendo uma capacidade de fixação de N_2 de pelo menos 20 a 25 mg por grama de glicose ou manitol consumida.

Morfologicamente, estas bactérias se diferenciam quer pelo tamanho, quer pela forma variável das células. Em alguns casos (*Azotobacter*), lembram leveduras ou algas marinhas; em outros, são similares a Eubacteriales, com depósitos gordurosos em corpos polares (*Beijerinckia*), ou formando células maiores, com vacúolos e inclusões gordurosas ao longo dos bacilos (*Derxia*). Em todos os casos, existe, no entanto, considerável pleomorfismo que dificulta a identificação das bactérias, baseado na observação morfológica. *Derxia indica* foi descrita como formando células menores e sendo capaz de utilizar sacarose, ao contrário de *Derxia gummosa*[13]. A individualidade dos diversos gêneros de bactérias fixadoras de N_2 foi estudada por De Ley & Park[4], os quais defenderam a separação de *Derxia* de *Azotobacter* e *Beijerinckia*, baseados nas determinações das porcentagens de guanina:citosina em seus ácidos nucleicos.

Tendo sido isoladas, de solos do Estado do Rio de Janeiro, bactérias fixadoras de N_2 com características próximas de determinadas espécies de *Derxia* e *Beijerinckia*, procuramos estudar algumas de suas propriedades fisiológicas. As seis amostras isoladas formavam, em meio sólido, colônias elevadas, lisas,

* Trabalho apresentado como assunto de tese para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, GB, Brasil.

** Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Fundação Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

branco-amareladas e amarelas, tornando-se gradativamente marrom-escuras e assumindo diâmetros de 1 cm ou mais. O crescimento era muito viscoso e extremamente tenaz, gomoso em zonas de maior abundância, mas amolecendo com o envelhecimento. Tal descrição se assemelha às descrições feitas para as primeiras amostras isoladas de *D. gummosa* e *D. indica*[10,13]. O crescimento das amostras em meio líquido envolvia a formação de anel na superfície, o qual evoluía para película grossa, enrugada e consistente, tornando-se marrom-escura com o tempo. Estas características culturais, acompanhadas do fato de algumas amostras fixarem até 20-27 mg N_2 por grama de glicose consumida, levou-nos a suspeitar de que as bactérias pertencessem ao gênero *Derxia*. Contudo, algumas características, posteriormente observadas, colocam certas amostras mais próximas do gênero *Beijerinckia*.

Se os microrganismos isolados representam novas espécies de *Derxia* ou variantes de espécies já descritas de *Beijerinckia* o presente trabalho não pôde discernir. O autor chama a atenção, no entanto, para a importância de presença eventual de fixadores de N_2 do tipo *Derxia* em solos brasileiros.

Material e Métodos

Foram estudadas seis amostras de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos do Estado do Rio de Janeiro e tentativamente classificadas como representantes do gênero *Derxia**.

As amostras foram mantidas, através de repiques trimestrais, no meio B, de Jensen & col.[10], livre de nitrogênio combinado, com a seguinte composição (g/ℓ): glucose 20, K_2HPO_4 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2; $CaSO_4$ 0,2; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,005; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,0005; com pH 6,5 ajustado com HCℓ 1N. O meio B, adicionado de agar (1,5%, Difco), foi distribuído em volumes de 5 mℓ em tubos de 130 X 15 mm com tampa de rosca, inclinados após esterilização em autoclave. A incubação foi feita a 32°C, por 10-15 dias.

Chakravorty & Das[3] foram capazes de preparar inóculo homogêneo e contendo $3,2 \times 10^{10}$ células/mℓ de *D. gummosa*. Com nossas amostras, houve dificuldade na obtenção de inóculo homogêneo e reprodutível, em parte devido à consistência das colônias formadas. Para contornar esta dificuldade, o seguinte procedimento foi utilizado: uma colônia grande, em meio sólido, foi transferida para erlenmeyer de 125 mℓ contendo 30 mℓ de meio B, líquido, o qual foi incubado a 32°C por 48-72 hr com agitação (150 rpm, em Gyratory Water Bath Shaker, New Brunswick); determinado volume desta cultura foi passado diversas vezes em seringa hipodérmica com agulha 26. Com este procedimento, foi obtida uma suspensão não totalmente homogênea no que toca à completa separação das células (observação microscópica), mas perfeitamente utilizável em termos de distribuição de massa, conforme foi confirmado pela determinação do peso seco de amostras contendo 2 gotas de pipeta Pasteur ou 0,5 mℓ de suspensão homogeneizada. Em todas as experiências, 2 gotas de suspensão foram inoculadas por tubo ou erlenmeyer.

Em todas as experiências de crescimento foi usado o meio B, de Jensen & col.[10], à exceção das provas bioquímicas de rotina, as quais seguiram os métodos usuais[5]. As experiências de utilização de fontes de carbono, utilização de fontes de nitrogênio, determinação da faixa de temperatura e de pH, foram feitas em tubos de 16 X 125 mm, com 5 mℓ de meio em cada, vedados com tampas de aço inoxidável (Belico Glass Inc.) e autoclavados a 120°C por 30 min. A incubação foi feita a 32°C. A leitura do crescimento, à exceção das experiências de inibição pelo O_2 atmosférico, foi feita por observação visual, anotando-se: - crescimento nulo; ± crescimento discreto; + crescimento médio; ++ crescimento abundante. Tal tipo de leitura foi o único praticável, tendo-se em vista o crescimento em película de dura consistência, desintegrando-se com o tempo, para dar um aspecto altamente viscoso às culturas em meio líquido, conforme foi observado em nossas amostras e igualmente em *Derxia gummosa*. As diferenças no crescimento, anotadas desta forma, eram suficientemente distintas para permitir perfeita reprodutibilidade nas leituras.

Para estudo da influência de aeração forçada, as amostras foram crescidas em erlenmeyers de 50 mℓ, contendo 30 mℓ de meio líquido. Quatro determinações foram feitas para cada sistema. A incubação foi feita com e sem agitação (180 rpm). Para a leitura do crescimento, foram retirados 5 mℓ de cada erlenmeyer e homogeneizados em seringa hipodérmica, a fim de ser feita a leitura da turvação em fotocolorímetro (Klett-Summerson, filtro verde 540 nm).

Para a dosagem de nitrogênio, culturas com agitação (150 rpm) foram obtidas em erlenmeyers de 125 mℓ, contendo 30 mℓ de meio B. A quantidade de nitrogênio fixado foi determinada pelo uso de técnica de micro-Kjeldahl[2,6].

Resultados

Utilização de fontes de carbono. Várias substâncias foram ensaiadas como fontes de C em meio básico, na

* Identificação feita pela Dra. Joanna Döbereiner, do Laboratório de Microbiologia do Solo, Instituto de Pesquisa e Experimentação Agro-pecuária do Centro Sul (IPEACS).

Tabela 1

Utilização de fontes de carbono por bactérias fixadoras de nitrogênio. Fontes de carbono na concentração de 20 g/ℓ; SN = sem adição de nitrogênio combinado; NO_3^- adicionado na concentração de 0,5 g/ℓ de KNO_3. Leituras de crescimento feitas conforme Material e Métodos; números representam dias de incubação.

Substratos	Amostras											
	D3		D4		D6		D9		D11		D12	
	SN	NO_3^-	SN	NO_3^-	SN	NO_3^-	SN	NO_3^-	SN	NO_3^-	SN	NO_3^-
Sacarose	+ 7	+ 7	+ 7	+ 7	± 7	+ 7	± 7	± 3	–	–	+ 7	+ 7
Galactose	± 17	–	± 17	–	–	–	–	–	–	–	± 17	± 17
Glicerol	± 7	± 17	+ 7	± 3	± 7	± 7	± 7	± 7	+ 7	+ 3	± 7	± 3
Etanol	± 17	–	± 10	–	± 17	–	± 10	–	+ 10	++ 17	+ 10	+ 24
Sorbitol	–	–	–	–	–	–	–	–	++ 7	++ 3	–	+ 17
Arabinose	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+ 24	+ 7
Xilose	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+ 7
Ramnose	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	± 7	+ 7
Glicose	+ 7	± 3	+ 7	± 3	++ 7	+ 3	+ 7	+ 3	+ 7	++ 3	++ 7	+ 3
Trealose	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	± 17	+ 7
Tween 80	+ 17	+ 17	+ 17	+ 17	+ 17	+ 17	+ 17	+ 17	+ 17	± 10	+ 17	+ 10
Manitol	–	–	–	–	–	–	–	–	+ 7	+ 3	± 24	+ 7
Asparagina	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+ 10	+ 10

Tabela 2

Utilização de fontes de nitrogênio por bactérias fixadoras de nitrogênio. Fontes de N na concentração de 0,5 g/ℓ; SC = sem adição de Ca^{++}; Ca^{++} adicionado na forma de $CaSO_4$ 0,1 g/ℓ. Leituras de crescimento conforme Material e Métodos; números representam dias de incubação.

Substratos	Amostras											
	D3		D4		D6		D9		D11		D12	
	SC	Ca^{++}	SC	Ca^{++}	SC	Ca^{++}	SC	Ca^{++}	SC	Ca^{++}	SC	Ca^{++}
Sem adição	± 7	± 7	± 7	± 7	± 7	± 7	± 7	± 7	± 7	± 7	± 7	± 7
Ácido L-glutâmico	++ 2	± 2	+ 2	++ 5	++ 2	+ 2	++ 2	± 2	++ 2	++ 2	++ 5	–
L-asparagina	++ 2	± 2	++ 2	± 2	++ 2	± 2	++ 2	++ 5	+ 2	+ 2	++ 5	–
$(NH_4)_2SO_4$	+ 2	–	++ 2	–	± 2	± 2	+ 2	± 5	+ 2	± 2	++ 5	–
KNO_3	++ 2	± 2	± 2	–	++ 2	± 2	++ 2	± 5	++ 2	± 2	++ 5	–
NH_4-citrato	+ 2	± 2	+ 2	+ 2	++ 2	++ 2	± 2	+ 2	++ 2	++ 2	++ 5	++ 5
Ácido L-aspártico	–	–	–	–	–	++ 2	–	–	–	++ 2	–	++ 5
Uréia	++ 2	± 2	++ 5	–	++ 2	+ 2	++ 5	++ 5	++ 2	++ 2	++ 5	± 5

presença ou não de nitrogênio combinado sob a forma de KNO_3 0,5 g/ℓ. Os resultados estão expressos na Tabela 1. Nenhuma das seguintes fontes de carbono foram utilizadas por qualquer uma das amostras estudadas: frutose, maltose, lactose, amido, celulose, formato, acetato, propionato, piruvato, succinato, malato e fumarato.

Utilização de fontes de nitrogênio combinado. Várias fontes de nitrogênio combinado foram ensaiadas, na presença ou não de Ca^{++} (adicionado sob a forma de $CaSO_4$). Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 2.

Crescimento em diversas temperaturas e valores de pH. As amostras estudadas apresentam o comportamento de bactérias mesófilas, como pode ser visto na Tabela 3. A temperatura ótima para as bactérias se situa entre 28 a 32°C. Na Tabela 4, estão repre-

Tabela 3

Faixa de temperatura para o crescimento de bactérias fixadoras de nitrogênio. Incubação durante 15 dias, sem agitação; meio B adicionado de glicose 20g/ℓ.

Temperatura	Amostras					
	D3	D4	D6	D9	D11	D12
20°C	–	–	–	–	–	–
28°C	+	++	++	+	+	+
32°C	+	++	++	++	++	+
37°C	+	±	±	±	+	±
40°C	±	±	±	±	±	±
41°C	–	–	–	–	–	–

Tabela 4

Faixa de pH e capacidade de acidificação de culturas de bactérias fixadoras de N_2. Leitura feita após 10 dias de incubação, exceto em *a* (21 dias) e em *b* (14 dias). Culturas em meio B + glicose 20 g/ℓ, sem agitação. Leituras de crescimento acordo com Material e Métodos. Valores para o pH final das culturas são dados entre parênteses.

pH inicial	Amostras					
	D3	D4	D6	D9	D11	D12
4,0	± (4,3)	± (4,0)	± (4,4)	± (4,2)	+ (4,5)[a]	± (4,4)
5,0	± (4,3)	+ (4,0)	+ (4,3)	+ (4,5)	++ (4,8)	± (4,5)
6,0	± (4,5)	+ (4,3)	++ (4,4)	+ (4,3)	+ (4,7)	+ (4,1)
7,0	+ (4,8)	++ (4,6)	++ (4,5)	++ (4,7)	++ (4,3)	+ (4,2)
8,0	± (4,4)	++ (4,0)	++ (4,8)	++ (4,6)	++ (5,2)	+ (4,1)
9,0	± (6,3)	+ (5,4)	++ (5,3)	+ (5,3)	++ (5,6)	± (4,5)
10,0	± (6,8)[b]	+ (5,8)[a]	± (5,8)[b]	± (6,6)	+ (6,0)	+ (5,6)[b]

sentados os resultados relativos ao crescimento em vários pH, bem como as medidas do pH final, mostrando a capacidade de acidificação do meio observada em todas as amostras.

Provas bioquímicas. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 5. Ênfase deve ser dada ao fato de todas as amostras produzirem catalase e reduzirem o nitrato, ao contrário da amostra tipo de *Derxia gummosa*[10].

Tabela 5

Provas bioquímicas de rotina para as amostras de bactérias fixadoras de nitrogênio. Leituras feitas até 11 dias de incubação.

Nome da prova	Amostras					
	D3	D4	D6	D9	D11	D12
Acidificação:						
Glicose	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+
Manitol	–	–	–	–	+	–
Galactose	–	–	–	–	–	–
Maltose	+	–	+	+	–	–
Sacarose	+	–	+	+	+	–
Lactose	–	–	–	–	–	–
V.M.	–	–	–	–	–	–
Nitrato (redução)	+	+	+	+	+	+
Produção:						
Indol	–	–	–	–	–	–
H_2S	–	–	–	–	–	–
Acetoína (V.P.)	–	–	–	–	–	–
Utilização:						
Malonato	+	+	+	+	+	+
Uréia	–	–	–	–	–	–
Desaminase:						
Fenilalanina	–	–	–	–	–	–
Descarboxilase:						
Ornitina	–	–	–	–	–	–
Arginina	–	–	–	–	–	–
Metabolismo energético:						
Metab. oxidativo (Hugh & Leifson)	+	+	+	+	+	+
Citocromo oxidase	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Motilidade	+	+	+	+	+	+

Inibição do crescimento pela aeração forçada em meios sem fonte de nitrogênio combinado. Os resultados da Tabela 6 representam o comportamento de apenas três amostras, mas todas as seis responderam identicamente. Clara inibição do crescimento bacteriano foi observada em meio sem a adição de N combinado em culturas agitadas a 180 rpm. Na presença de nitrogênio combinado, na forma de asparagina ou KNO_3, houve crescimento rápido, estimulado pela aeração forçada. O crescimento em meio sem fontes de N combinado foi sempre mais lento, necessitando 240 hr de incubação para a primeira leitura.

Determinação quantitativa do nitrogênio fixado. Na Tabela 7, pode-se observar o rendimento de fixação de N_2 entre as amostras estudadas. Enquanto as amostras D9 e D11 fixaram N_2, em níveis de 27,2 e 24,7 mg por grama de glicose consumida, outras amostras, especialmente a D6, realizaram fixação de N_2 em nível abaixo da concentração habitual da amostra de *Derxia gummosa*[10].

Discussão

Na apresentação dos resultados, algumas considerações devem ser feitas sobre a classificação do grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio estudadas. Bactérias do gênero *Azotobacter*, além de formarem células maiores do que as de bactérias gram-negativas comuns, com apreciável pleomorfismo, caracterizam-se pelo fato de não formarem ácidos ou outros produtos orgânicos em condições ótimas de respiração. Tal propriedade é compatível com o fato de vários ácidos orgânicos serem utilizados como fontes de carbono para *Azotobacter*. Contrariamente, membros do gênero *Beijerinckia* formam células de tama-

Tabela 6

Inibição de bactérias fixadoras de nitrogênio pela aeração forçada em meio sem fonte de nitrogênio combinado; estímulo em presença de fontes de N_2. Meio básico + glicose 20 g/ℓ; resultados expressos em unidades Klett representam médias de 4 determinações; culturas obtidas com (c/Ag) e sem (s/Ag) agitação.

Fonte de N_2 combinado	Incubação (hr)	Amostras					
		D6		D9		D11	
		c/Ag	s/Ag	c/Ag	s/Ag	c/Ag	s/Ag
Sem adição	240	0	213	0	230	0	272
L - asparagina 0,5 g/ℓ	48	317	169	612	168	532	213
KNO_3 0,5 g/ℓ	48	214	123	452	92	423	100

Tabela 7

Rendimentos de fixação de N_2 (mg N_2 por grama de glicose consumida) em culturas agitadas. Meio básico + glicose 10 g/ℓ; temperatura de incubação 32°C; valores são médias de duas determinações.

Incubação (dias)	Amostras					
	D3	D4	D6	D9	D11	D12
4	6,27	10,9	6,93	18,1	3,63	8,91
6	16,2	16,8	13,9	21,4	7,59	14,2
8	19,8	17,5	15,6	27,2	24,7	20,8
10	18,8	18,1	15,2	27,1	24,4	19,8
12	18,5	17,5	14,8	26,7	24,1	20,5

nho comparável à maioria de Eubacteriales, sem cistos. Seu metabolismo resulta na formação de ácidos orgânicos que acidificam marcadamente o meio. Em paralelo com esta propriedade, *Beijerinckia* apresenta uma acentuada ácido-tolerância, crescendo numa faixa de valores de pH de 3 a 9. Culturas de *Beijerinckia*, em meio sólido, podem formar colônias incolores, turvas, as quais podem assumir coloração marrom-ferrugem, de consistência viscosa e extremamente tenaz, assemelhando-se, neste aspecto, a *Derxia*. Tanto *D. gummosa*[10] como *D. indica*[13] não crescem em pH de valores inferiores a 4,5-5,0, o que contrasta com a ácido-tolerância de *Beijerinckia*, embora sejam capazes de acidificar meios contendo fontes de C assimiláveis. Enquanto *Beijerinckia* cresce muito pobremente em meio sólido com manitol, *D. gummosa* e *D. indica* utilizam eficientemente este poliálcool. *D. indica* diferencia-se de *D. gummosa* em seu ciclo morfológico, formando células menores, sendo capaz de utilizar sacarose como fonte de C e crescendo muito fracamente em meio de agar-sulfato de amônio-glicose. É de interesse ressaltar que, apesar de membros de *Derxia* serem aeróbicos estritos, com metabolismo oxidativo, não formam catalase, ao contrário de 24 amostras de *Azotobacter* e *Beijerinckia* estudadas por Jensen & col.[10], todas catalase-positivas.

As amostras estudadas no presente trabalho assemelham-se culturalmente às do gênero *Derxia*. Seu rendimento na fixação de N_2 é compatível com esta hipótese. É provavel, no entanto, que o grupo de amostras seja heterogêneo, conforme parecem indicar algumas de suas propriedades fisiológicas. Todas as amostras cresceram com glicose e glicerol como fontes de carbono; todas, com exceção de uma, utilizaram a sacarose, característica que diferencia *D. indica* de *D. gummosa*. A exemplo destas últimas espécies, nossas amostras foram igualmente incapazes de crescer com ácidos orgânicos. A única discrepância a estes resultados é a aparente utilização de malonato nas condições das provas bioquímicas usuais, empregadas na identificação rotineira de enterobactérias. Isto pode, no entanto, ser um artefato na leitura da prova, a qual não é especialmente destinada à classificação de bactérias fixadoras de N_2. Nossas amostras foram, por outro lado, capazes de iniciar o crescimento em meios com pH inicial ajustado a 4,0. Tal comportamento coloca estas bactérias mais próximas do gênero *Beijerinckia* do que de *Derxia*, cujas espécies são menos ácido-tolerantes.

Xilose e arabinose, além de não serem utilizadas por expécies de *Derxia* e por nossas amostras, inibem o crescimento destas últimas, fato que merece atenção, pois estas pentoses são encontradas nos solos como produtos de decomposição de hemicelulose.

Nossas amostras, a exemplo da amostra tipo de *D. gummosa*, crescem com várias fontes de nitrogênio combinado, inclusive com sulfato de amônio, o qual é utilizado muito lentamente por *D. indica*. Ions de cálcio, presentes no meio de Jensen & col.[10] exercem uma ligeira inibição em nossas amostras. Em presença de citrato de amônio, o cálcio não inibe o crescimento, talvez devido à ação quelante do citrato. *Azotobacter chroococcum* e *Azotobacter vinelandii* não necessitam cálcio para seu crescimento[1]. *Azotobacter agile* desenvolve-se bem sem cálcio adicionado[8]; este ion parece inibir, nesta bactéria, a nitrogenase[7].

Enquanto a amostra tipo de *D. gummosa* cresce entre 15 a 42°C, nossas amostras não crescem a 20°C, nem a 41°C. O crescimento máximo foi obtido entre 28 e 37°C, sendo o ótimo de temperatura em torno de 32°C.

Duas características parecem afastar nossas amostras da espécie *D. gummosa.* A amostra tipo de *D. gummosa* não reduz nitrato, nem produz catalase, ao contrário das seis amostras de bactérias fixadoras de nitrogênio estudadas no presente trabalho. Outras provas bioquímicas, em particular as que determinam a formação de ácido a partir de carboidratos e álcoois, apresentaram, para nossas amostras, resultados discrepantes daqueles observados nas experiências de utilização de fontes de carbono. Glicose e glicerol foram utilizados como fontes de C e oxidados por todas as amostras, enquanto outros carboidratos mostraram resultados variáveis. Esse comportamento heterogêneo pode ser devido aos diferentes meios de cultura em que foram crescidas as bactérias, pois, enquanto para a utilização de fontes de C os meios não contêm nitrogênio combinado, os meios nas provas bioquímicas usuais contêm peptona. As mesmas considerações são válidas para as provas de VM e VP, que apresentaram resultados negativos.

A inibição pela aeração forçada foi observada no presente trabalho: todas as seis amostras foram inibidas em meio sem nitrogênio combinado, quando este foi submetido à agitação. O mesmo não ocorreu quando as amostras cresceram em presença de nitrogênio combinado, asparagina ou KNO_3, o que denota claramente a diferença no metabolismo energético destas bactérias, nas duas condições. O efeito de O_2 na fixação biológica de N_2 foi investigado principalmente em bactérias aeróbicas das espécies *A. vinelandii* e *A. chroococcum.* Parker & Scutt[11,12] mostraram que a inibição pelo O_2 da fixação de N_2 em *A. vinelandii* é competitiva. Os autores sugeriram que O_2 e N_2 possam competir com aceptores alternados de elétrons da cadeia respiratória e consideraram a fixação de N_2 como forma de respiração. Recentemente, foi obtida evidência para a inibição não competitiva de O_2 da redução de N_2, acetileno, azida e cianeto, pela nitrogenase extraída de *A. vinelandii*[14]. Hill[9] observou que, em concentrações de oxigênio inferiores a 0,2 atm, não ocorre o dimorfismo colonial em *D. gummosa,* havendo apenas formação de colônias grandes. Tal dimorfismo colonial foi constantemente observado em nossas amostras.

Em conclusão, embora os presentes dados não permitam classificar com precisão as amostras, é certo que devem pertencer a espécies quer do gênero *Derxia,* quer *Beijerinckia,* o que poderá ser analisado pelo estudo da composição de bases de seus ácidos nucleicos, tal como foi feito previamente para este grupo de bactérias[4]. O estudo da freqüência destas bactérias fixadoras assimbióticas de N_2 será de interesse ao conhecimento da atividade metabólica de solos brasileiros.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Luiz R. Travassos a orientação durante o preparo deste trabalho, o qual contou com o apoio do Conselho Nacional de Pesquisas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, e Conselho de Pesquisas da UFRJ. Agradecemos à Dra. Johanna Döbereiner a cessão das amostras de bactérias fixadoras de nitrogênio estudadas no presente trabalho.

Referências Bibliográficas

1. BECKING, J.H. — Studies on the nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia.* II. Mineral nutrition and resistance to high levels of certain elements in relation to soil type. *Plant and Soil,* 14:297-321, 1961.
2. BRADSTREET, R.B. — The Kjeldahl method for organic nitrogen. New York, Academic Press Inc., 1965.
3. CHAKRAVORTY, S.C., & DAS, N.B. — Studies on nitrogen fixation and respiractory activity of *Derxia* gummosa. *Indian J. exp. Biol.,* 3:234-239, 1965.
4. DE LEY, J., & PARK, I.W. — Molecular biological taxonomy of some free-living nitrogen-fixing bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.,* 32:6-16, 1966.
5. EDWARDS, P.R., & EWING, W.H. — Identification of *Enterobacteriaceae* Minnesota, Burgess Pub. Co., 1962.
6. FONTANA, P. — Considerações sobre a dosagem de N pelo método de Kjeldahl. *Mem. Inst. Osw. Cruz,* 51: 277-288, 1953.
7. HARDY, R.W.F., & KNIGHT, E. JR. — Reductant dependent adenosine triphosphatase of nitrogen-fixing extracts of *Azotobacter vinelandii. Biochim. biophys. Acta,* 122: 520-531, 1966.
8. HILGER, F. — Études sur la systématique du genre *Beijerinckia* Derx. *Ann. Inst. Pasteur,* 109:406-423, 1965.
9. HILL, S. — Influence of oxygen concentration on the colony type of *Derxia gummosa* grown on nitrogen-free media. *J. gen. Microbiol.,* 67:77-83, 1971.
10. JENSEN, H.L.; PETERSEN, E.J.; DE, P.K. & BHATTACHARYA, R. — A new nitrogen-fixing bacterium: *Derxia gummosa* nov. gen. nov. spec. *Arch. Mikrobiol.,* 36:182-195, 1960.
11. PARKER, C.A. & SCUTT, P.B. — Competitive inhibition of nitrogen fixation by oxygen. *Biochim. biophys. Acta,* 29:662, 1958.
12. PARKER, C.A. & SCUTT, P.B. — The effect of oxygen on nitrogen fixation of *Azotobacter. Biochim. biophys. Acta,* 38:230-238, 1960.
13. ROY, A.B. & SEN, S. — A new species of *Derxia. Nature,* 194:604-605, 1962.
14. WONG, P.P. & BURRIS, R.H. — Nature of oxygen inhibition of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash),* 69:672-675, 1972.

Sensibilidade de bactérias gram-negativas da flora urinária a antibióticos: comparação entre germes isolados em hospital geral e em clínica privada

Moema Magnavita G. Oliveira,* Milton Barros, Facelucia Barros & Heonir Rocha

Resumo

A avaliação do antibiograma, pelo método da diluição em tubos, foi feita em 204 raças de bactérias gram--negativas, isoladas de pacientes com infecção do trato urinário. Destas, 122 foram isoladas de pacientes de hospital geral e 82 de clínica particular. Entre as amostras, 96 eram *E. coli,* 45 pertenciam ao grupo *Klebsiella-Enterobacter,* 45 eram *Proteus* sp. (indol-positivos e indol-negativos) e 18 *Pseudomonas* sp. Foram testados os antibióticos gentamicina, kanamicina, cefalotina, carbenicilina e ampicilina. Todas as raças testadas se mostraram sensíveis a 6,3 mcg/mℓ de gentamicina, o agente que exibiu maior eficácia. As amostras de *E. coli* se mostraram mais sensíveis do que as demais. Praticamente, não houve diferença de sensibilidade entre as bactérias procedentes da clínica privada e as do hospital geral, com exceção à kanamicina frente a *E. coli, Klebsiella-Enterobacter* e *Proteus* sp. É provável que o fator determinante de maior significação na sensibilidade de gram-negativos, isolados de infecção urinária, se relacione ao tipo de doente e à natureza da infecção.

Summary

Sensitivity of gram-negative bacteria from urinary flora to antibiotics: a comparison between germs isolated in general hospital and a private clinic

Antibiotic sensitivity, by the tube dilution method, was performed with 204 strains of gram-negative bacteria isolated from patients with urinary tract infection. Of those strains, 122 derived from patients admitted to a general hospital and 82 from a private clinic. There were 96 strains of *E. coli,* 45 of *Klebsiella-Enterobacter,* 45 *Proteus* sp. (both indol-positive and indol-negative), and 18 *Pseudomonas* sp. All were tested against gentamycin, kanamycin, cephalotin, carbenicillin, and ampicillin. All strains were inhibited and killed by a 6.3 mcg/mℓ concentration of gentamycin, the most potent of the drugs tested. Strains of *E. coli* exhibited the highest degree of sensitivity to all agent tested. There were no differences between the sensitivity of the strains isolated from hospital as compared to the private clinic patients, except for kanamycin which showed a slightly higher effectiveness against *E. coli*, members of *Klebsiella--Enterobacter* and *Proteus* sp. recovered from the outpatients from the private clinic. It is possible that the most probable and important determinant for the sensitivity pattern of gram-negative bacteria isolated from the urinary tract are the nature of the host and the type of urinary infection installed.

Introdução

A flora infectante do trato urinário geralmente se constitui de bactérias gram-negativas do grupo das enterobactérias, sendo bem menor a participação das gram-positivas[8]. A sensibilidade destas bactérias aos antibióticos não pode, geralmente, ser previsível com exatidão, podendo variar com alguns fatores. As infecções agudas são produzidas, em geral, por bactérias sensíveis a uma multiplicidade de antibacterianos, ao contrário das infecções crônicas e, principalmente, das infecções complicadas por processos obstrutivos. Nestes casos, bactérias naturalmente resistentes a vários agentes terapêuticos aumentam muito de prevalência.

Dentre os inúmeros fatores que podem alterar a flora de uma infecção urinária, queremos destacar a influência do ambiente hospitalar, e do uso de antibióticos. Existe flora urinária nosocomial, que se apresenta geralmente mais resistente aos agentes antimicrobianos[6]. De outra parte, a mais frequente manipulação de doentes internados, através de procedimentos endoscópicos e cateterização vesical, introduz, no trato urinário, bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos. O tratamento de uma infecção urinária pode oferecer a oportunidade da bactéria infec-

* Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

tante desenvolver resistência ao agente terapêutico durante o uso do produto, uma eventualidade rara, mas que já tem sido documentada para alguns antimicrobianos[7]. Mais comumente, o medicamento propicia uma re-infecção por germe mais resistente. Todos estes fatos justificam, em tese, diferenças da flora bacteriana de infecção urinária hospitalar, quando comparada à de doentes em serviço de ambulatório.

No presente trabalho, utilizando método quantitativo de realização do antibiograma, pareceu-nos de interesse determinar a sensibilidade da flora infectante do trato urinário, obtida de doentes atendidos num hospital geral, onde existe maior proporção de casos complicados ou manipulados, e compará-la com a de uma clínica privada, exclusivamente ambulatorial. Procuramos, além de determinar o padrão geral de eficácia dos antibióticos mais comumente usados, investigar se havia tendência à maior resistência das raças bacterianas, isoladas do ambiente hospitalar.

Material e Métodos

Foi avaliada a sensibilidade de 204 raças bacterianas recentemente isoladas de pacientes com infecção urinária, sendo 122 provenientes do Hospital Prof. Edgard Santos e 82 de uma clínica privada de atendimento exclusivamente ambulatorial — Clínica São Lucas, Salvador, BA. Foram selecionadas, para esta análise, raças de gram-negativos mais habitualmente encontrados nas referidas infecções: 96 raças de *E. coli*, 45 de *Klebsiella-Enterobacter*, 45 de *Proteus* sp. (indol-negativo e indol-positivo) e 18 de *Pseudomonas aeruginosa*. À exceção das raças de *Ps. aeruginosa*, isoladas exclusivamente do Hospital, para todas as outras houve número aproximado de raças da clínica privada e do hospital geral. Para o teste de sensibilidade, foi usado, como meio de cultura, o caldo infuso de coração Difco. Os antibióticos foram utilizados nas concentrações descrescentes de 100 mcg/ /mℓ até 0,19 mcg/mℓ, colocados no volume de 0,5 mℓ em tubos de hemólise. Um inóculo de 10^3 da bactéria, em caldo infuso de coração, foi colocado em cada tubo, completando o volume para 1 mℓ.

As leituras foram feitas após 24 horas de incubação de 37°C, considerando-se concentração mínima inibitória (CIM) aquela que inibisse totalmente o crescimento das bactérias, deixando o tubo inteiramente claro. Todos os tubos foram, depois, subcultivados em agar sangue, após 24 horas de incubação, para observar a concentração bactericida.

Cada amostra foi estudada, ao mesmo tempo, frente a cinco antibióticos: gentamicina, kanamicina, carbenicilina, cefalotina e ampicilina. A análise dos resultados foi feita tomando-se em conta a percentagem cumulativa de sensibilidade de cada amostra aos diversos antibióticos, comparando-se as amostras obtidas do hospital geral com aquelas da clínica privada.

Resultados

Sensibilidade das raças de E. coli — Em 100% das amostras houve sensibilidade à gentamicina na diluição de 0,75 mcg/mℓ. A sensibilidade foi também elevada frente à kanamicina (67% das raças na diluição de 6,3 mcg/mℓ). Carbenicilina e cefalotina só mostraram atividade, para mais de 50% das raças, nas concentrações de 12,5 a 25 mcg/mℓ, respectivamente. Houve elevada resistência à ampicilina. Na comparação feita frente aos diversos antibióticos, observamos que as raças da clínica privada foram um pouco mais sensíveis apenas à kanamicina do que as do hospital geral (Fig. 1).

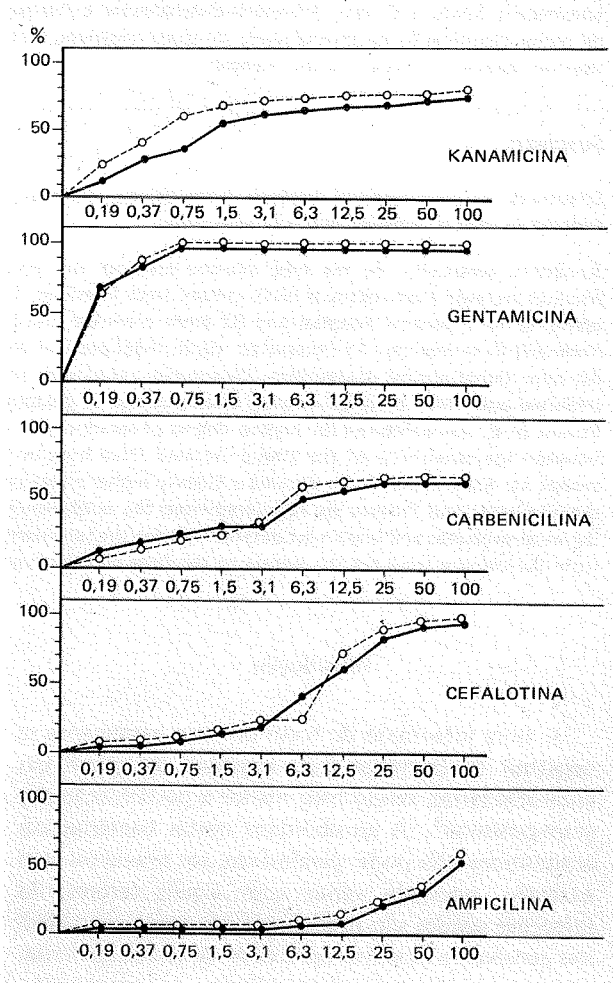


Fig. 1 — Padrão de sensibilidade das raças de *E. coli*, isoladas de pacientes de hospital geral (HPES) e de uma clínica privada ambulatorial (CSL).

Sensibilidade de bactérias do grupo Klebsiella-Enterobacter — Gentamicina, na diluição de 3,1 mcg/mℓ, se mostrou eficaz contra 95,5% delas; na concentração de 6,3 mcg/mℓ, atingiu 100%. Kanamicina é também eficaz contra bactérias deste grupo. Na concentração de 6,3 mcg/mℓ, inibiu 75% das raças. Houve resistência acentuada aos efeitos da carbenicilina e ampicilina. Na concentração de 12,5 mcg por mℓ, a cefalotina inibiu apenas 46/6% (Fig. 2).

Sensibilidade de bactérias do gênero Proteus — Os antibióticos que mostraram maior eficácia contra *Proteus* sp. (indol-positivo e negativo) foram a kanamicina, gentamicina e carbenicilina. Kanamicina, na concentração de 3,1 mcg/mℓ, inibiu 66,6% das raças, enquanto que, na concentração de 6,3 mcg/mℓ, mostrou-se eficaz contra 75,5%. Gentamicina, na concentração de 1,5 mcg/mℓ, inibiu 100% das raças. Já a carbenicilina, na concentração de 25 mcg/mℓ, atuou sobre 85% das raças de *Proteus* estudadas (Fig. 3).

Sensibilidade de bactérias do gênero Pseudomonas — Apenas a gentamicina mostrou elevada eficácia. Na dose de 3,1 mcg/mℓ, inibiu 94,0% das raças; na concentração de 6,3 mcg/mℓ, atingiu 100%. Carbenicilina só exibiu atividade nas concentrações de 50 mcg/mℓ e 100 mcg/mℓ, conseguindo eficácia contra 61,1% e 77,7% das raças, respectivamente (Fig.4).

Comparação da sensibilidade das raças do hospital geral com as da clínica privada (ambulatorial) — Apenas frente à kanamicina pareceu haver maior resistência das raças bacterianas isoladas do hospital geral. Isso se verificou com *E. coli*, bactérias do grupo *Klebsiella-Enterobacter* e *Proteus* sp. Para os outros

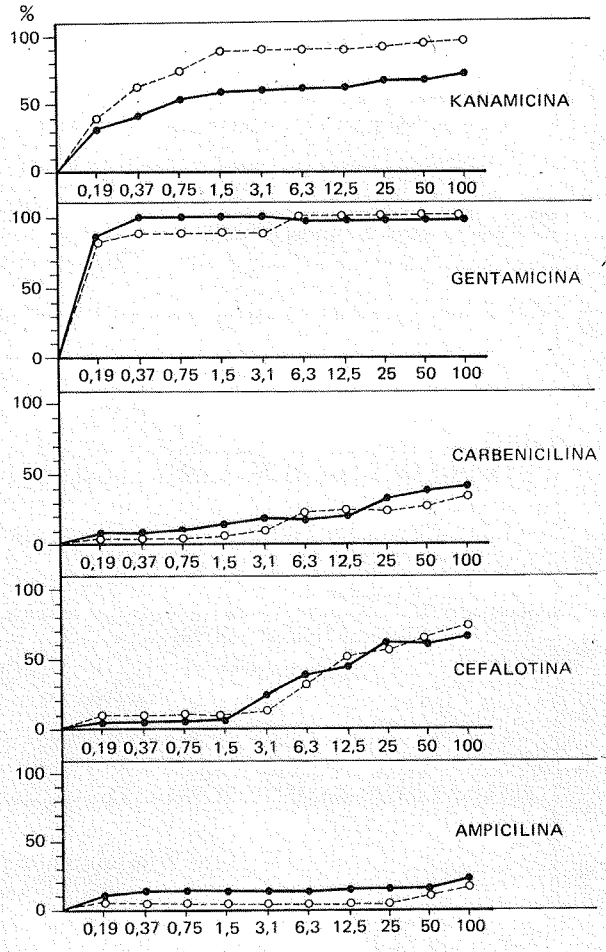


Fig. 2 — Padrão de sensibilidade das raças de *Klebsiella-Enterobacter* isoladas de hospital geral (HPES) e de clínica privada ambulatorial (CSL).

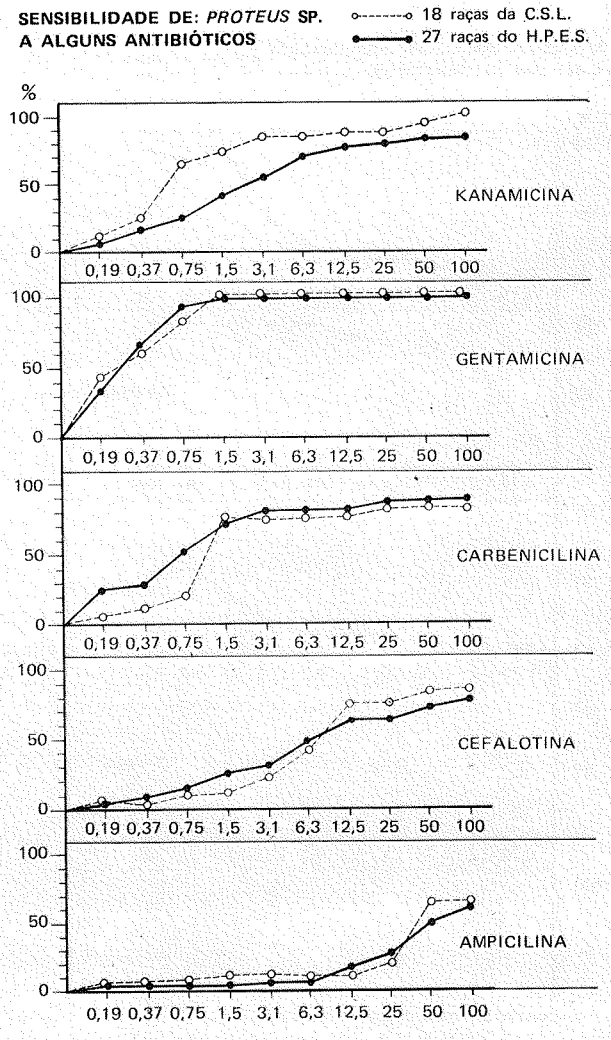


Fig. 3 — Padrão de sensibilidade de raças de *Proteus* sp. isoladas de pacientes de hospital geral (HPES) e de clínica privada (CSL).

antibióticos, a sensibilidade das raças bacterianas se equivaleu, quer proviessem elas da clínica privada (ambulatorial) ou do hospital geral.

Comparação da eficácia dos diversos antibióticos testados — O antibiótico que mostrou maior eficácia *in vitro* foi a gentamicina, que, na concentração de 6,3 mcg/mℓ, inibiu 100% das raças bacterianas testadas. Kanamicina também exibiu grande eficiência, atingindo (à exceção das raças de *Ps. aeruginosa*) 75% das raças testadas, na concentração de 6,3 mcg/ /mℓ. A eficácia da carbenicilina se fez mais nítida sobre bactérias do gênero *Proteus*, *Pseudomonas* e sobre *E. coli*, em concentrações que variaram de 50 mcg/mℓ a 100 mcg/mℓ. Cefalotina, na concentração de 12,5 mcg/mℓ, inibiu 68% das raças de *E. coli* e *Proteus* sp. . A menor eficácia foi exibida pela ampicilina. A atuação de cada antibiótico estudado, sobre as diversas raças bacterianas, se acha esquematizada nas Figuras 5 a 9.

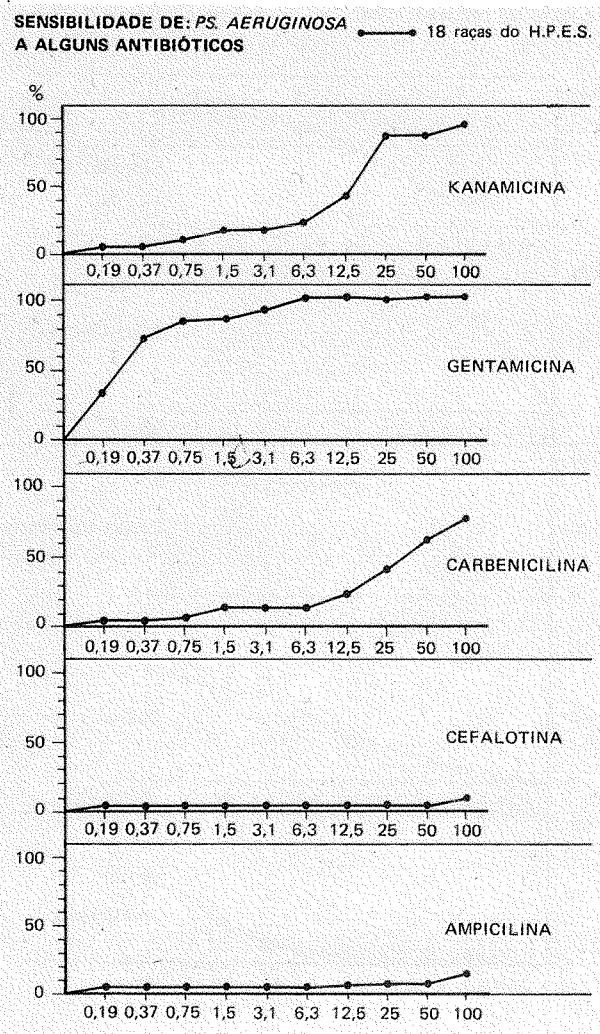


Fig. 4 — Padrão de sensibilidade de raças de *Ps. aeroginosa* isoladas de pacientes de hospital geral (HPES).

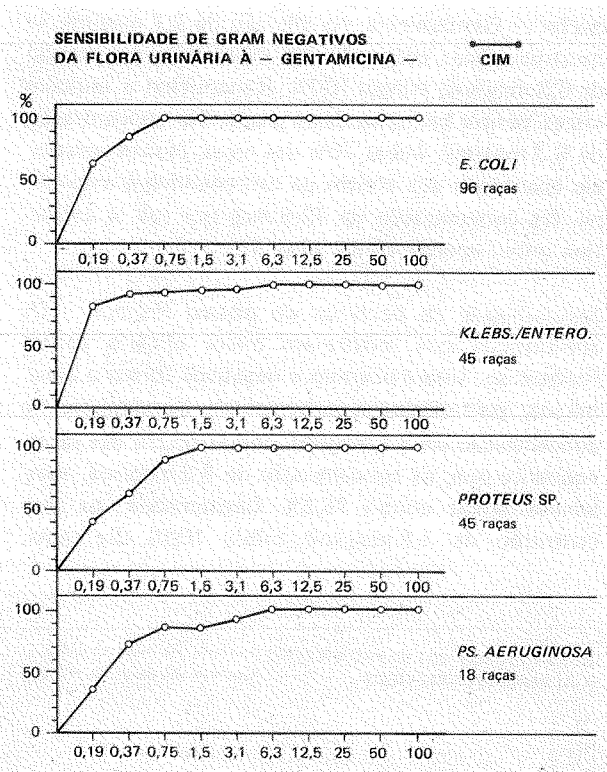


Fig. 5 — Atividade de gentamicina sobre alguns gram-negativos isolados de pacientes com infecção do trato urinário.

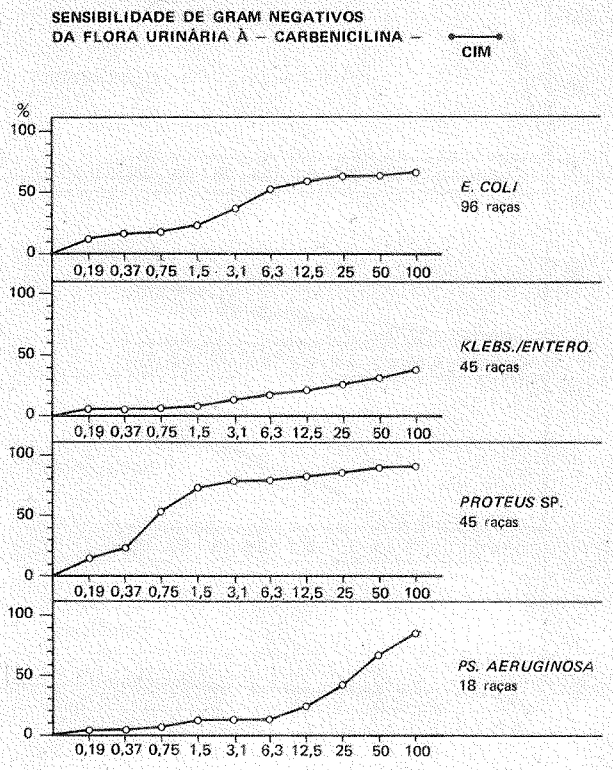


Fig. 6 — Atividade da kanamicina sobre alguns gram-negativos isolados de pacientes com infecção do trato urinário.

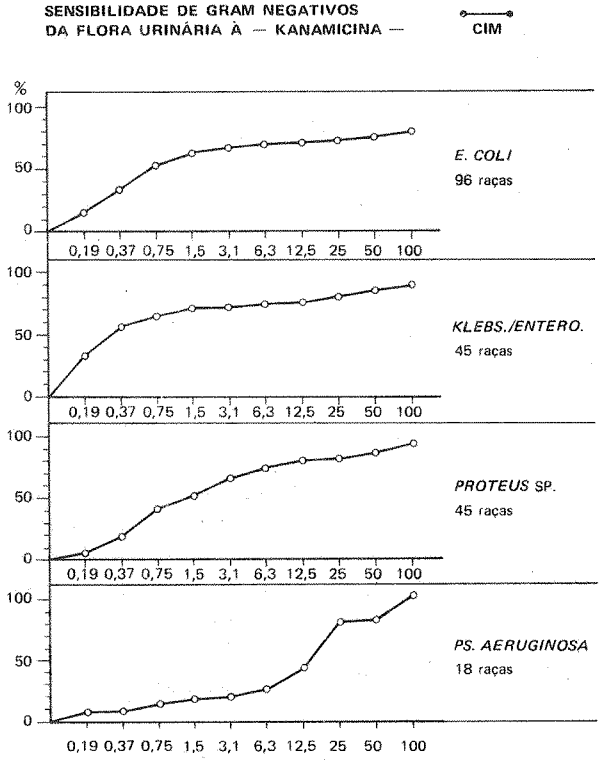


Fig. 7 — Atividade da cefalotina sobre alguns gram-negativos isolados de pacientes com infecção do trato urinário.

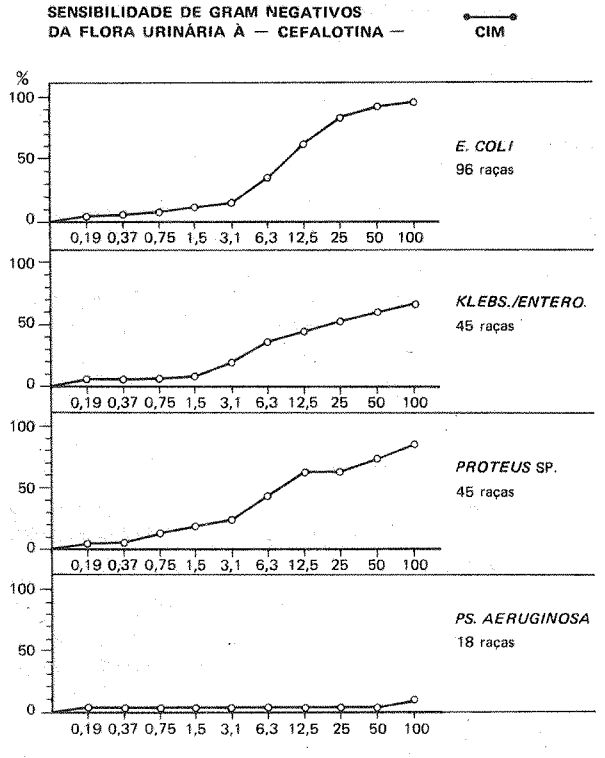


Fig. 8 — Atividade da carbenicilina sobre alguns gram-negativos isolados de pacientes com infecção do trato urinário.

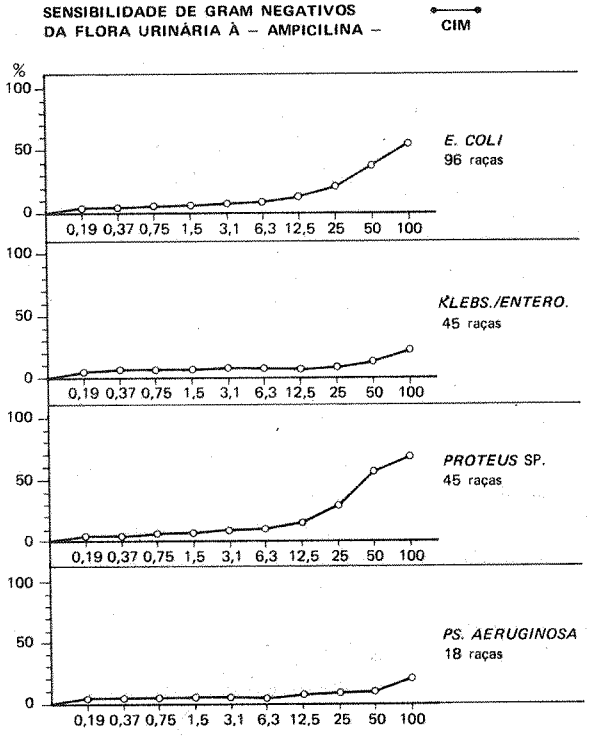


Fig. 9 — Atividade da ampicilina sobre alguns gram-negativos isolados de pacientes com infecção do trato urinário.

Discussão

O advento da antibioticoterapia trouxe, como conseqüência, alteração na ecologia das infecções bacterianas, fato já bem documentado na literatura[5,9]. Houve considerável mudança na flora infectante de pacientes com bacteremia, com aumento na freqüência de germes gram-negativos, assim como na mortalidade de pacientes bacterêmicos. De outra parte, houve nítida diminuição na prevalência de infecção estafilocócica hospitalar, passando a predominar as infecções por germes gram-negativos[9]. Neste particular, tem sido destacada a freqüência de infecção urinária adquirida no hospital[1,10,11].

De um modo geral, a sensibilidade dos germes gram-negativos estudados correspondeu ao que tem sido relatado em outros centros. O antibiótico que evidenciou maior eficácia *in vitro* foi a gentamicina, que inibiu 100% das amostras examinadas na concentração de 6,3 mcg/mℓ, concentração passível de ser obtida no sangue com doses terapêuticas habituais do produto.

As raças de *E. coli* se mostraram, em geral, mais sensíveis do que as demais. As bactérias do grupo *Klebsiella-Enterobacter* evidenciaram elevada resistência à ampicilina e carbenicilina.

Praticamente, foi muito pequena a diferença no padrão de sensibilidade das bactérias isoladas no hospital geral e na clínica privada. Apenas frente à kanamicina — um antibiótico de uso quase exclusivamente parenteral, e mais utilizado em ambiente hospitalar — houve maior sensibilidade das raças de *E. coli, Proteus* sp., e bactérias do grupo *Klebsiella-Enterobacter* isoladas do serviço ambulatorial. Esta falta de diferença na sensibilidade da flora de doentes hospitalizados e ambulatoriais pode decorrer de alguns fatores:

1. é possível que, nas infecções urinárias do pessoal hospitalizado, fosse pequeno o número de "infecções nosocomiais". Os doentes hospitalizados, na maioria dos casos, já traziam sua infecção urinária ou desenvolveram-na no hospital, independente da "flora nosocomial";
2. é grande, em nosso meio, a utilização indébita de antibióticos pelos doentes ambulatoriais, do tipo dos que foram incluídos neste estudo;
3. foi elevado o número de casos de bacteriúria assintomática e de pielonefrite crônica nos pacientes da clínica privada, por ser um local de referência de portadores de infecção do trato urinário.

Têm surgido opiniões divergentes acerca do fenômeno da aquisição de resistência antimicrobiana por parte de bactérias gram-negativas com o passar dos anos, na era antibiótica[3,4,12]. Em comunicação prévia, deste laboratório, não foi observado aumento de resistência da flora urinária, em avaliação de cinco anos consecutivos[8]. Gillespie & Linton[5] também documentaram mínima alteração na sensibilidade de coliformes infectantes do trato urinário, numa avaliação de 12 anos (resistência à sulfonamida passou de 6% a 12%, e resistência à ampicilina de 2% a 11%). Vale destacar que Bauer[2], comparando 720 raças de *E. coli*, isoladas de uma clínica privada, com 1528 raças colhidas de um hospital de ensino, documentou maior resistência das bactérias provindas do hospital, particularmente à ampicilina e tetraciclina. Resistência à ampicilina freqüentemente se associava à resistência à tetraciclina, cefalotina, cloranfenicol, e, às vezes, sulfonamidas — o que sugeriu ser decorrente da transferência de um fator de resistência bacteriana. Bauer utilizou o método do disco, para a determinação do antibiograma, e não discutiu a diferença na qualidade dos doentes hospitalizados e da clínica particular. As diferenças de sensibilidade, apontadas por ele, foram relativamente pequenas.

Não é de surpreender a existência de dados discordantes na literatura, acerca deste assunto. A diferença de sensibilidade entre a flora infectante de pacientes hospitalizados e de ambulatório pode se tornar nítida, se houver diversidade apreciável de material clínico nos dois setores. Havendo mais casos agudos e de infecção urinária baixa, haverá maior número de *E. coli* sensível à maioria dos antibacterianos. Sendo maior a proporção de casos crônicos, ou de casos complicados por processo obstrutivo, haverá maior prevalência de bactérias do grupo *Klebsiella-Enterobacter, Proteus* sp. e *Pseudomonas* sp., resistentes a vários antibióticos. A existência de uma flora urinária "nosocomial" é inegável, mas contribui relativamente pouco numa avaliação comparativa, como a que foi feita no presente trabalho.

Referências Bibliográficas

1. ADLER, J.L. & SHULMAN, J.A. — Nosocomial infection and antibiotic usage at Grady Memorial Hospital. A prevalence survey. *Sth. med. J.*, 63:102-105, 1970.
2. BAUER, A.W. — Drug resistance of urinary tract pathogens cultured from ambulatory patients in the community in 1969. *J. Urol.*, 106:750-756, 1971.
3. BULGER, R.J.; LARSON, E. & SHERRIS, J.C. — Decreased incidence of resistance to antimicrobial agents among *Escherichia coli* and *Klebsiella-Enterobacter*. Observations in a University Hospital over a 10 year period. *Ann. Int. Med.*, 72:65-71, 1970.
4. FINLAND, M. — Changing ecology of bacterial infections as related to antibiotic therapy. *J. infect. Dis.*, 122:419-431, 1970.
5. GILLESPIE, W.A. & LINTON, K.B. — Changes in sulphonamide and antibiotic resistance of *E. coli* in urinary infections outside hospital during 12-year period. *J. clin. Path.*, 24:767, 1971.
6. KENNEDY, R.P.; PLORDE, J.J. & PETERSDORF, R. G. — Evidence for a nosocomial gram-negative flora. *In* Kass, E.H., editor. Progress in pyelonephritis, pp. 111-117, Philadelphia, F.A. Davis Co., 1965.
7. LINDEMEYER, R.I.; TURCK, M. & PETERSDORF, R. G. — Factors determining the outcome of chemoterapy in infections of the urinary tract. *Ann. Intern. Med.*, 58:201-216, 1963.
8. ROCHA, H. & OLIVEIRA, M.M.G. — Flora bacteriana das infecções do trato urinário: variações de sensibilidade aos antibióticos num período de cinco anos. *Rev. Ass. méd. bras.*, 18:203-206, 1971.
9. ROGERS, D.E. — Changing pattern of life-threatering microbial disease. *New Eng. J. Med.*, 261:677-683, 1959.
10. ROSENBLATT, M.B.; ZIZZA, F. & BEEK, I. — Nosocomial infections. *Bull. N.Y. Acad. Med.*, 45:10-12, 1969.
11. THOBURN, R.; FEKETY, F.R.Jr. & CLUFF, L.E. — Infections acquired by hospitalized patients. *Arch. intern. Med.*, 121:1-10, 1968.
12. TRUANT, J. — A three-year survey of the antibacterial spectra of the more commonly used chemotherapeutic agents. *Canad. med. Ass. J.*, 96:589-596, 1967.

Epidemiologia e diagnóstico laboratorial de *Trichomonas vaginalis**

Geraldo A. De Carli** & Beatriz Machado**

Resumo

Ocorrência do protozoário *Trichomonas vaginalis* na secreção uretral de 82 homens (exame a fresco) e secreção vaginal de 500 mulheres (exame a fresco e cultura de material). Incidência de 69,5% (57 casos) positivos para a secreção uretral; 21,6% (108 casos) positivos para secreção vaginal através de exame a fresco e 29,4% (147 casos) através de cultura de material.

Summary

Epidemiology and laboratory diagnostic of Trichomonas vaginalis

Occurrence of the protozoan *Trichomonas vaginalis* in secretion from the urethra of 82 men (fresh microscopic examination) and from the vagina of 500 women (fresh microscopic examination and cultured material). Incidence of 69.5% (57 cases) positive identification by direct microscopic observation of urethral secretion; 21.6% (108 cases) positiveness by direct observation and 29.4% (147 cases) from cultured vaginal secretions.

Introdução

A tricomoníase humana é causada por *Trichomonas vaginalis,* encontrado no trato urogenital do homem ou da mulher. No homem, esta doença pode ser sintomática ou assintomática e a presença do protozoário pode ser diagnosticada em casos de uretrites crônicas ou agudas. Na mulher, pode também ser assintomática, mas, geralmente, há um aumento da secreção vaginal (leucorréia), prurido e ardência da genitália, com eventual irritação aguda.

Na avaliação, tanto epidemiológica como terapêutica, é de grande importância o correto diagnóstico da doença e o sucesso do tratamento depende da acurada demonstração da presença do agente. O propósito deste estudo foi determinar a incidência de *T. vaginalis* em nosso ambiente, em ambos os sexos, e mostrar a grande importância do uso de meios de cultura no diagnóstico da tricomoníase.

Material e Métodos

Foram examinados 82 homens e 500 mulheres, procedentes de clínicas privadas, ambulatórios, centros de saúde e de hospitais de Porto Alegre, RS, Brasil.

Aos homens, foi solicitado que comparecessem ao local da coleta do material, pela manhã, antes de terem urinado no dia e que não estivessem tomando qualquer medicamento tricomonicida há mais de uma semana. As mulheres foram instruídas a não realizarem a higiene local (duchas) ou usarem medicamentos vaginais durante um período de 24 a 48 horas antes do exame e da coleta do material.

Os pacientes não foram selecionados quanto à cor ou idade e, em todos os casos, foram previamente examinados por ginecologistas ou urologistas que recomendavam a pesquisa de *T. vaginalis.*

A coleta da secreção uretral foi realizada com alça de platina e, a da secreção vaginal, do fundo do saco de Douglas, mediante pipeta tipo Papanicolaou. Não foram usados cotonetes (swabs) para a coleta das secreções, visto que, durante um estudo inicial, verificaram-se muitos resultados falso-positivos.

O material de ambas secreções foi examinado a fresco; para secreção vaginal foi feito também isolamento em cultura.

Para reconhecer *T. vaginalis* e distingui-lo, de outras células, foram observadas, tanto nos exames a

* Apresentado no III Congresso Brasileiro de Microbiologia, Belo Horizonte, MG, Brasil, julho 1971.
** Depto. de Análise, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

fresco como após a cultura, a forma, o tipo de núcleo, o número de flagelos, a presença da membrana ondulante e a motilidade, nos aspectos que caracterizam a tricomona[1,2,7,14,15].

Exame a fresco: é o método mais comumente usado para a pesquisa do protozoário, em virtude de sua simplicidade e rapidez. Entretanto, é duvidoso que esta técnica seja suficientemente válida quando os protozoários são muito raros. Uma gota da secreção vaginal ou uretral foi misturada a uma gota de solução fisiológica estéril em uma lâmina de microscopia e coberta com uma lamínula. A preparação foi levemente aquecida e imediatamente examinada em um microscópio com 200 aumentos. As tricomonas se destacavam por sua grande motilidade entre os elementos celulares das secreções.

Exame cultural: depois de preparado o esfregaço a fresco, a secreção da pipeta de Papanicolaou (de 0,5 a 1,0 mℓ) foi inoculada em meio de cultura. Após 24 horas, uma gota do sedimento do meio, colocada em uma lâmina de microscopia e coberta com uma lamínula, foi examinada da mesma maneira que o esfregaço a fresco. O período de crescimento foi estabelecido entre 24 a 120 horas, sendo as culturas incubadas a 37°C, e examinadas diariamente, com intervalos variáveis. Foram consideradas negativas quando não se observou crescimento até 5 dias de incubação. O meio usado foi o desenvolvido por Kupferberg, Johnson & Sprince[10] em que os componentes tripticase (BBL) 20 g, cisteína clorídrica 1,5 g, maltose 1,0 g e agar 1,0 g são dissolvidos em 960 mℓ de água destilada e o caldo aquecido em banho-maria até a completa dissolução do agar. O meio foi filtrado, o pH estabelecido em 6,0 e acrescentado 0,6 mℓ de azul de metileno a 0,5% como indicador. Distribuiu-se então 9,5 mℓ de meio em tubos de ensaio (18 X 180 mm) os quais foram autoclavados a uma atmosfera durante 15 minutos. A esterilização do meio foi testada a 37°C, durante 24 horas. Antes da inoculação da secreção vaginal, os tubos permaneceram 15 minutos na estufa a 37°C e, a cada tubo, foi adicionado, previamente, 0,5 mℓ de soro de cavalo, mantido congelado, não diluído, inativado e esterilizado por filtração em Seitz. Para inibir o crescimento de bactérias e fungos, foram adicionadas, a cada tubo com meio, 5.000 unidades de penicilina cristalina G potássica, 1.000 microgramos de dihidroestreptomicina e 300 unidades de nistatina* por mℓ. As soluções concentradas foram preparadas com água destilada estéril e mantidas congeladas; as diluições foram refrigeradas, com o tempo de validez de uma semana.

* Amostra 2090A — Micostatina micropulverizada (Nistatina) controle 2380, cedida pela Squibb Industrial Química S.A.

Resultados

A incidência de *T. vaginalis* nas secreções uretrais e vaginais está apresentada na Tabela 1, discriminada quanto ao sexo, o método e o resultado dos exames, tanto em valores absolutos como relativos.

O exame a fresco de secreções uretrais de 82 homens, todos com história clínica de uretrites, revelou 57, isto é 69,5%, de casos positivos, sendo pois 25, isto é 30,5% negativos. Não foram feitas culturas face à reduzida quantidade do material que se conseguiu recolher da uretra.

Tabela 1

Resultados da pesquisa de *Trichomonas vaginalis*

Sexo	Nº de pacientes	método de exame	Positivos	Negativos	Total de exames
Masculino	82	a fresco	57 (69,5%)	25 (30,5%)	82 (100,0%)
Feminino	500	a fresco	108 (21,6%)	392 (78,4%)	500 (100,0%)
		em cultura	147 (29,4%)	353 (70,6%)	500 (100,0%)

No exame a fresco de secreções vaginais de 500 mulheres, 108 casos, isto é 21,6%, revelou o protozoário, enquanto que, em 392 casos, isto é 78,4%, o resultado foi negativo.

O exame após cultura de secreções vaginais das 500 mulheres estudadas deu resultado positivo em 147 casos (29,4%) e negativo em 363 casos (70,6%).

Comparando-se a percentagem de positivos, dos exames após cultura, com a de positivos dos exames a fresco, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa ($P > 0,01$).

Discussão

Os resultados mostraram maior incidência do protozoário nas secreções uretrais do que nas secreções vaginais, nos grupos estudados. Embora a diferença tivesse sido muito significativa ($P > 0,01$), não nos parece lícita a comparação imediata entre as amostras porque, enquanto os homens foram examinados quando manifestaram sintomatologia de uretrites e conseqüentemente secreção uretral, as mulheres examinadas apresentavam leucorréia ou ardência e prurido da genitália externa e, em muitos casos, elas compareciam ao laboratório encaminhadas pelo ginecologista após um exame ginecológico periódico. É evidente pois, que as populações que deram origem às amostras apresentam características diferentes quanto à própria sintomatologia da doença. Contudo, isto alerta para a grande incidência de *T. vaginalis* no homem, confor-

Tabela 2

Pesquisa de *Trichomonas vaginalis* no homem, realizada por diversos autores

Autor	Ano	Nº de pacientes	Casos positivos	
			Nº	%
Liston & Lees[12]	1940	400	16	4,0
Lanceley & McEntegart[11]	1953	310	16	5,3
Sorel[16]	1954	288	35	12,1
Feo & col.[5]	1956	183	33	18,0
Whittington[17]	1957	321	39	12,5[a]
Whittington[17]	1957	81	23	28,4[b]
De Carli & Machado*	1971	82	57	69,5

a. pacientes brancos b. pacientes pretos
* presente trabalho

me foi observado quando existem sintomas de uretrite.

A Tabela 2 mostra os resultados de pesquisas de *T. vaginalis* no homem por diversos autores, observando-se que a proporção de casos positivos, entre os examinados é muito variável. Em nosso trabalho, encontramos o protozoário em 69,5% dos pacientes, enquanto Whittington[17], que até agora havia descrito a maior incidência, observou apenas 28,4%. Na mulher, segundo dados apresentados, na Tabela 3, os autores também divergem muito na magnitude de casos observados (de 8,1% a 60,9%). Encontramos, no sexo feminino, apenas 29,4% de casos positivos entre as pacientes examinadas. Face à grande incidência que verificamos no homem, é importante que sejam feitas investigações epidemiológicas muito bem controladas desta doença no sexo masculino, pois pode ocorrer que o homem seja um vetor significativo na transmissão do flagelado.

Nos exames das secreções vaginais, verificou-se que, se o exame a fresco era positivo, a cultura da secreção também era positiva. Porém, em muitos casos, o exame a fresco foi negativo e, após a cultura, o diagnóstico foi positivo. Neste último caso, a diferença, a favor do exame cultural, foi considerada estatisticamente significativa ($P > 0,01$).

A Tabela 4 mostra os resultados da pesquisa de *T. vaginalis* na mulher, por diversos autores, em preparações a fresco e após cultura. Todos os autores consultados encontraram uma incidência maior de casos positivos nos exames após a cultura do que a fresco, devendo chamar-se a atenção para a grande diferença de resultados observada por Martin & col.[13]. Em nosso trabalho, a incidência foi de 21,6%, no exame a fresco, e 29,4%, no exame após a cultura.

Considera-se, em geral, que o exame a fresco é procedimento muito mais simples do que a técnica de cultura, sendo necessário, porém, ressaltar que, quando se opta pelo exame a fresco, este deve ser realizado imediatamente após a coleta do material, pois,

Tabela 3

Pesquisa de *Trichomonas vaginalis* no homem, realizada por diversos autores

Autor	Ano	Nº de pacientes	Casos Positivos	
			Nº	%
Johnson & Mayne[8]	1948	1197	321	26,8
Kean & Day[9]	1954	500	80	16,0
Gardner & col.[6]	1957	2251	182	8,1[a]
Gardner & col.[6]	1957	325	96	29,5[b]
Gardner & col.[6]	1957	668	303	45,3[c]
Burch & col.[3]	1959	1512	123	8,1[b]
Burch & col.[3]	1959	335	204	60,9[c]
Martin & col.[13]	1963	100	51	51,0
Carneri & col.[14]	1968	304	63	20,7
De Carli & Machado*	1971	500	147	29,4

a. pacientes brancas, clínica privada. b. pacientes brancas, ambulatório. c. pacientes pretas, ambulatório
* presente trabalho

Tabela 4

Comparação entre os dois métodos para a pesquisa de *Trichomonas vaginalis* na mulher, realizada por diversos autores

Autor.	Ano	Nº de pacientes	Método de exame			
			A fresco		Em cultura	
			Nº	%	Nº	%
Kean & Day[9]	1954	500	61	12,2	80	16,0
Martin & col.[13]	1963	100	34	34,0	51	51,0
Carneri & col.[4]	1968	304	43	14,2	63	20,7
De Carli & Machado*	1971	500	108	21,6	147	29,4

* presente trabalho

ao contrário, corre-se o risco de resultados falso-negativos. Quando, porém se adota o meio de cultura na pesquisa de *T. vaginalis*, este meio pode permanecer à temperatura ambiente, antes de ser incubado, segundo Kean & Day[9] e confirmado neste trabalho, por um período de até três horas, sem alteração na capacidade de desenvolvimento do protozoário nas culturas.

Agradecimentos

Agradecemos ao Professor Edgar Mário Wagner pela análise estatística, sugestões e críticas na redação deste trabalho. Agradecemos, também, aos ginecologistas e urologistas que selecionaram os pacientes e ao técnico de laboratório, Sr. Eni Nunes, pela assistência na preparação dos meios de cultura.

Referências Bibliográficas

1. BARRETO, M.P. & ZAGO FILHO, B. – Comportamento da "Trichomonas vaginalis" Donné, 1837 e da "Trichomonas Tenax" (D. F. Müller, 1773) em meio de cultura viscoso. *Rev. bras. Biol.,* 17:501-508, 1957.
2. BLAND, P.B. & RAKOFF, A.E. – The incidence of trichomonads in the vagina, mouth and rectum. *J. Amer. med. Ass.,* 108:2013-2016, 1937.
3. BURCH, T.A.; REES, C.W. & REARDON, L.V. – Epidemiological studies on human trichomoniasis. *Amer. J. trop. Med. Hyg.,* 8:312-318, 1959.
4. CARNERI, I.D.; 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.
5. FEO, L.G.; VARANO, N.R. & FETTER, T.R. – *Trichomonas vaginalis* in urethritis of the male. *Brit. J. vener. Dis.,* 32:233-235, 1956.
6. GARDNER, H.L.; DAMPEER, T.K. & DUKES, C.D. – The prevalence of vaginitis. A study in incidence. *Amer. J. Obstet. Gynec.,* 73:1080-1087, 1957.
7. HONIGBERG, B.M. & KING, V.M. – Structure of *Trichomonas vaginalis* Donné. *J. Parasit.,* 50:345-364, 1964.
8. JOHNSON, C.G. & MAYNE, R. – Study of the incidence and occurrence of symptoms of vaginal trichomonads and various species of yeast in pregnancy. *Amer. J. Obstet. Gynec.,* 55:852-858, 1948.
9. KEAN, B.H. & DAY, E. – *Trichomonas vaginalis* infection. An evaluation of three diagnostic techniques with data on incidence. *Amer. J. Obstet. Gynec.,* 68:1510-1518, 1954.
10. KUPFERBERG, A.B.; JOHNSON, G. & SPRINCE, H. – Nutritional requirements of *Trichomonas vaginalis. Proc. Soc. exp. Biol.,* 67:304-308, 1948.
11. LANCELEY, F. & Mc ENTEGART, M.G. – *Trichomonas vaginalis* in the male. The experimental infection of a few volunteers. *Lancet,* 264:668-671, 1953.
12. LISTON, W.G. & LEES, R. – *Trichomonas vaginalis* infestation in male subjects. *Brit. J. vener Dis.,* 16:34-55, 1940.
13. MARTIN, R.D.; KAUFMANN, R.H. & BURNS, M. – *Trichomonas vaginalis* vaginitis. A statistical evaluation of diagnostic methods. *Amer. J. Obstet. Gynec.,* 87:1024-1027, 1963.
14. PEREIRA, C. & ALMEIDA, W.F. – Sobre a verdadeira natureza das "Formas Amebóides" dos pretensos "Cistos" e formas degenerativas do gênero *Trichomonas* Donné, 1836. *Arquiv. Inst. Biol.,* 11:347-366, 1940.
15. SMITH, B.F. & STEWART, B.T. – Fine structure of *Trichomonas vaginalis. Exp. Parasit.,* 19:52-63, 1966.
16. SOREL, C. – Apreçu sur le *Trichomonas vaginalis* chez l'homme. Critique des méthodes de recherches du parasite. Exposé des techniques, p. 16-19. *In* Ambrose, S. & *col.* – Les urétrites non gonococciques, Paris, Masson et Cie, 1957.
17. WHITTINGTON, M.J. – Epidemiology of infections with *Trichomonas vaginalis* in the light of improved diagnostic methods. *Brit. J. vener. Dis.,* 33:80-91, 1957.

Estudo preliminar das propriedades antifúngicas por bacilos saprófitas do ar e solo

C. M. F. S. Serôdio*, J. C. Calleya**, L. M. H. Sousa** & R. Boelter***

Resumo

Ensaios biológicos para antagonismo envolvendo dois bacilos não identificados, X-1272 do solo e Y-173 do ar, e diversos fungos saprófitas e parasitas, foram realizados. Fenômenos antifúngicos por colônias de bactérias são preliminarmente descritos.

Summary

Preliminary study of antifungal properties by two saprophyte bacilli from the air and soil

Biological assay for antagonism involving two unidentified bacilli, X-1272 from soil and Y-173 from air, and several both saprophyte and pathogenic fungi were performed. Preliminary antifungal phenomena by bacterial colonies are described.

Introdução

O isolamento de substâncias com ação antimicrobiana, obtidas da fermentação de microrganismos do solo, tem constituído preocupação constante de um largo setor da pesquisa farmacológica desde o descobrimento da penicilina por Fleming[1,2].

Entre os agentes produtores de antibióticos, é oportuno salientar que têm sido os actinomicetos do solo os que se revelaram mais fecundos na pesquisa deste tipo de substâncias. Contudo, importantes agentes antimicrobianos foram também isolados de outros esquizomicetos, eumicetos, líquens, algas e, sob o nome de fitoncidas ou "antibiotic-like substances"[5], foram obtidos compostos com propriedades idênticas, a partir de vegetais superiores. Muitos destes compostos foram, posteriormente, produzidos sinteticamente ou semi-sinteticamente e, da intervenção nos processos químicos de diversas fases de sua obtenção, resultaram ainda derivados com novas propriedades[3,4,5,7].

A grande maioria dos antibióticos obtidos tem demonstrado preferencial, quando não exclusiva, ação sobre bactérias e são, com notáveis exceções[5,6], relativamente poucos aqueles que, possuindo importante atividade contra fungos e bactérias superiores, se revelaram suscetíveis de aplicação na terapêutica das micoses do organismo animal, não obstante ser este um campo da farmacologia a que a terapêutica moderna reivindica, com insistência, meios para um mais eficaz controle destas doenças de significativa e crescente importância nos tempos presentes.

Este estudo preliminar relata as propriedades biológicas antifúngicas de dois bacilos saprófitas não identificados, designados X-1272 e Y-173. A observação inicial dos fenômenos foi fruto do acaso.

Material e Métodos

O bacilo X-1272 contaminou, ocasionalmente, uma partida de anéis de papel de filtro destinada a testes de sensibilidade de fungos****, a qual contatou com o solo por erro de manipulação. O desenvolvimento de colônias do referido bacilo, após a colocação dos anéis em superfície de gelose de Sabouraud,

* Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas, Brasil, atualmente no Dept. de Fisiologia, Faculdade de Medicina Veterinária y Zootécnia, Universidade Nacional Autónoma do México, México, D.F.

** Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas, Brasil.

*** Disciplina de Farmacologia dos Animais Domésticos, Depto. de Fisiologia, UFSM, Santa Maria, RG, Brasil.

**** "Método do Anel", método inédito para avaliação de sensibilidade de fungos e poder antifúngico de fármacos, idealizado pelo autor C.M.F.S.S. e atualmente em fase de experimentação. Utiliza anéis (arcos de círculo) de papel de filtro e destina-se a testes em meio de cultura sólido.

inibiu o crescimento de colônias de *Microsporum canis*, repicadas no interior dos anéis. O bacilo Y-173 contaminou uma placa de Petri com gelose de Sabouraud, tendo sido provavelmente veiculado pelo ar, durante sua manipulação.

Quarenta e oito horas depois, foi possível observar halos de inibição em volta de colônias do bacilo, afetando o crescimento de colônias de *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger.*

O estudo preliminar dos fenômenos de antibiose detectados constituiu-se em duas etapas. A primeira constou de testes de antagonismo frente a diversos fungos saprófitas, de rápido crescimento, não identificados, em meio de Sabouraud, gelosado. As bactérias foram semeadas no centro de placas de Petri e incubadas a 32°C, durante o tempo necessário para a formação de colônias com diâmetro compreendido entre 8 e 10 mm. Em cada placa foi então semeada suspensão de esporos de um fungo, em pontos equidistantes da colônia bacteriana central e situados na periferia do círculo definido pelo meio de cultura. Esta etapa foi realizada com a intenção de avaliar, de forma genérica, a natureza da antibiose em questão. O uso de fungos saprófitas, na sua maioria dotados de marcada resistência a fatores adversos ao desenvolvimento, de rápido crescimento e grande expansibilidade no meio de cultura, permite a obtenção fácil de resultados bem caracterizados e a curto prazo.

A segunda etapa de estudo constou de testes idênticos aos mencionados, porém com a utilização de fungos patogênicos. Foram realizados ensaios com *Tricophyton mentagrophytes, Tricophyton equinum, Microsporum canis, Microsporum gypseum, Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Sporotrichum schenkii, Phialophora pedrosoi, Aspergillus fumigatus* e *Nocardia brasiliensis*. A presença de actinomiceto patogênico entre os fungos de prova foi devida ao fato de que este grupo de microrganismos é, por razões de ordem tradicional, estudado em micologia, juntamente com os fungos verdadeiros.

Resultados

A primeira etapa do estudo foi destinada à observação da antibiose sobre fungos saprófitas. Não houve interesse na identificação das espécies, se bem que tivessem ocorrido formas mais ou menos sensíveis e até completamente resistentes. Comparando o comportamento dos dois bacilos nos ensaios, Y-173 revelou possuir espectro mais largo e potente.

Os resultados da segunda etapa estão esquematizados na Tabela 1, cuja análise revela que ambos os bacilos exerceram inibição sobre o crescimento de fungos patogênicos, mas, também nestes ensaios, o bacilo Y-173 revelou espectro mais largo.

Os resultados sugerem a existência de princípios metabólicos ativos dos bacilos X-1272 e Y-173, em meio de Sabouraud, os quais, veiculados no meio de cultura, inibem o crescimento de diversos fungos saprófitas e patogênicos.

A produção, extração, isolamento e caracterização dos princípios previstos, determinação do seu espectro antimicrobiano e a identificação dos dois bacilos em causa serão as próximas etapas deste estudo.

Tabela 1

Ação inibitória dos bacilos X-1272 e Y-173 sobre o crescimento de fungos patogênicos

Espécies	Antibiose	
	X-1272	Y-173
Trichophyton mentagrophytes	+	+
Trichophyton equinum	+	+
Microsporum canis	+	+
Microsporum gypseum	+	+
Candida albicans	+	+
Cryptococcus neoformans	+	+
Sporotrichum schenkii	-	+
Phialophora pedrosoi	-	+
Aspergillus fumigatus	+	+
Nocardia brasiliensis	+	+

Referências Bibliográficas

1. FLEMING, A. — On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium* with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae. Brit. J. exp. Path.*, 10:226-236, 1929.
2. FLEMING, A. — Penicillin. Its practical application. Philadelphia, Blakiston, 1946.
3. GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. — As bases farmacológicas da terapêutica. 3ª ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1967.
4. KUSCHINSKY, G. & LULLMANN, H. — Manual de farmacologia. Barcelona, Ed. Marín S/A, 1967.
5. LACAZ, C.S. — Antibióticos. Conceituação. Agentes produtores. Aspectos microbiológicos. Classificações. Súmula dos principais antibióticos utilizados na prática médica. *In* LACAZ, C.S. (ed.) — Antibióticos, São Paulo, Fundo Editorial Procienx, p. 1-65, 1965.
6. LACAZ, C.S. — Medicações antifúngicas, *In* LACAZ, C.S.; MINAMI, P.S. & PURCHIO, A. (ed.) — O grande mundo dos fungos, p. 235-247. São Paulo, Edit. USP e Edit. Polígono, 1970.
7. OSELKA, G.W. & COL. — Antibióticos na prática médica. São Paulo, Edit. Gremed. Ltda., 1972.