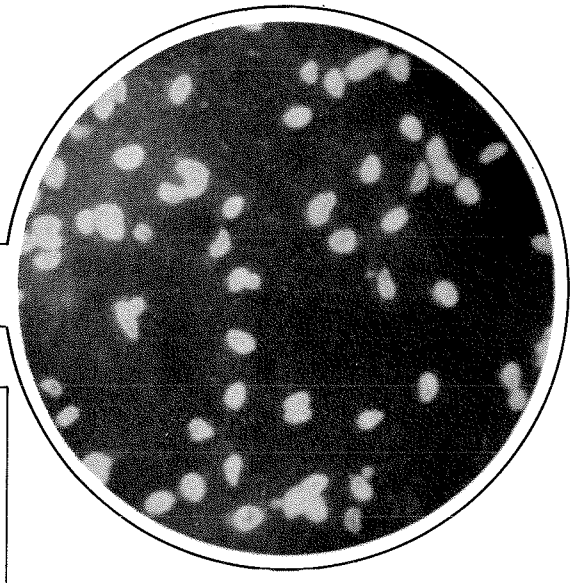
Volume 4 Número 4 Out.-Dez. 1973

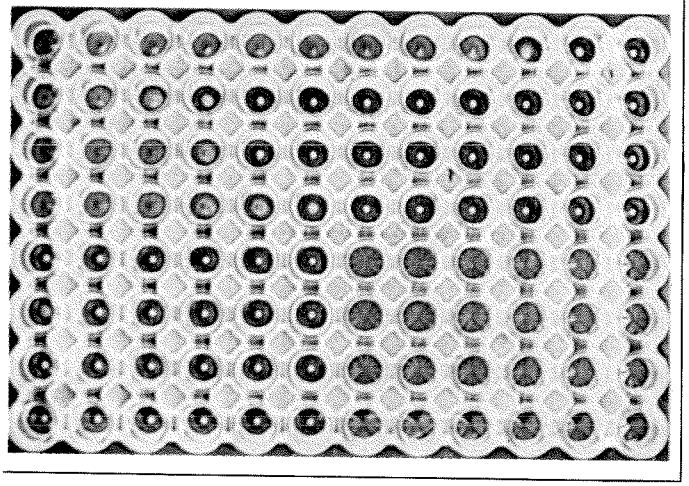
Revista de Microbiologia

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

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

CELM

– solicite folhetos e listas de preços –

Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 4 Outubro-Dezembro 1973 Número 4

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

CONTEÚDO – CONTENTS

Artigos originais

Dosagens microbiológicas de vitaminas em peixes e crustáceos. II-Tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantotênico, riboflavina e piridoxina [*Microbiological assays of vitamins in fishes and crustaceans. II-Thiamine, biotin, nicotinic acid, pantothenic acid, riboflavin and pyridoxin*] – Sílvio Ribeiro & Isaac Roitman 61

Agar eosina-azul de metileno modificado para inibição do crescimento invasor de *Proteus* spp [*A modified eosin-methylene blue agar to inhibit swarming of Proteus spp*] – Elsa F. Rodrigues de Oliveira, João Ramos Costa Andrade, Alexandre Adler Pereira & Italo Suassuna 67

Isolamento e incidência do parvovírus bovino no Brasil [*Isolation and incidence of bovine parvovirus in Brazil*] – Fúlvio José Alice 73

Notas breves

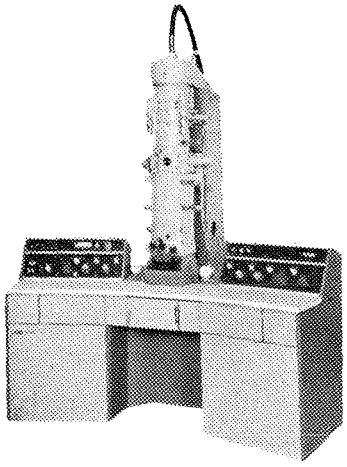
Isolamento de *Corynebacterium haemolyticum* de vaginite humana [*Isolation of Corynebacterium haemolyticum from human vaginitis*] – R.M. Yanaguita, C.A. Santa Rosa & M.C. Martin 79

Staphylococcus em farinha de mandioca vendida a granel [*Staphylococcus from manihot flour sold unpacked*] – Manoel Tachard Barbosa 81

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

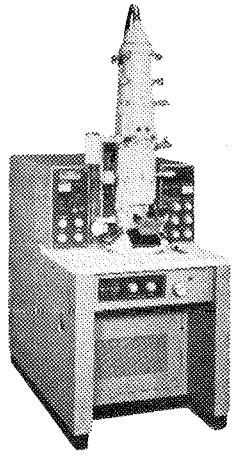


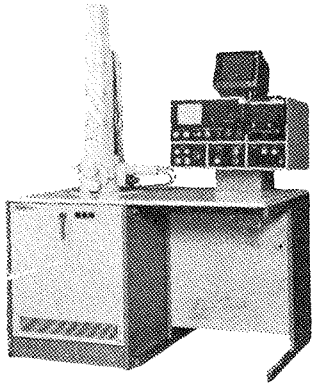
Microscópio Eletrônico JEM-100B

- 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 (mμ) e micromico (μμ). 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.

Dosagens microbiológicas de vitaminas em peixes e crustáceos. II — Tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantotênico, riboflavina e piridoxina*

Sílvio Ribeiro** & Isaac Roitman***

Resumo

O teor de algumas vitaminas foi determinado em peixes e crustáceos, através de métodos microbiológicos. *Ochromonas danica* foi utilizada para as dosagens de tiamina e biotina e *Tetrahymena pyriformis* para as dosagens de ácido nicotínico, ácido pantotênico, riboflavina e piridoxina. As porções comestíveis (filés) dos seguintes peixes e crustáceos foram estudadas, antes e após sofrerem cozimento: sardinha (*Sardinella aurita*); corvina (*Micropogon furnieri*); goete (*Cynoscion petranus*); pescada foguete (*Macrodon ancylodon*); pescada cambucu (*Cynoscion virescens*); camarão rosa (*Penaueus brasiliensis*) e camarão sete barbas (*Xiphopenaueus kroyeri*). Na maioria dos pescados analisados, o processo de cozimento causou uma perda de vitaminas. No entanto, em sardinha e corvina, o material submetido ao cozimento apresentou um teor de tiamina ligeiramente superior ao produto "in natura". No camarão sete barbas, também o produto cozido apresentou um teor de ácido nicotínico ligeiramente superior ao produto cru. Esses resultados foram discutidos, considerando-se a existência de tiaminase nos peixes e a presença de análogos do ácido nicotínico nos crustáceos. Os resultados obtidos foram comparados com os anteriormente relatados na literatura.

Summary

Microbiological assays of vitamins in fishes and crustaceans. II — Thiamine, biotin, nicotinic acid, pantothenic acid, riboflavin, and pyridoxin

The vitamin contents of several fishes and crustaceans were determined by microbiological methods for the assays of the following vitamins: thiamine, biotin, nicotinic acid, pantothenic acid, riboflavin and pyridoxin. The edible portions of the following fishes and crustaceans were studied, before and after cooking: sardine (*Sardinella aurita*), croaker (*Micropogon furnieri*), weakfish (*Cynoscion petranus*), sea-trout (*Macrodon ancylodon*), sea-trout (*Cynoscion virescens*), shrimps (*Penaueus brasiliensis* and *Xiphopenaueus kroyeri*). The protozoans used were: *Ochromonas danica* for the assay of thiamine and biotin and *Tetrahymena pyriformis* for nicotinic acid, pantothenic acid, riboflavin and pyridoxin. After cooking, the majority of the studied specimens showed a decrease in vitamin content. However, sardine and croaker showed an increase in thiamine after being cooked; the shrimp *Xiphopenaueus kroyeri* showed an increase in nicotinic acid after cooking. These results are tentatively interpreted as due to the enzymatic degradation of thiamine and the presence of nicotinic acid analogs in the crustaceans. The results obtained were compared with those reported in the literature.

Introdução

O conhecimento do valor nutritivo de produtos do mar, consumidos no Brasil, é limitado. Alguns autores estudaram a composição química, determinando, principalmente, proteínas, lipídios e sais minerais. Silva & col.[23] frisam a existência de uma lacuna quanto ao conhecimento do teor de vitaminas em peixes e crustáceos consumidos pelos brasileiros.

Em trabalho anterior[21], foram determinados os teores de ácido fólico, colina e vitamina B_{12} em peixes e crustáceos de grande consumo na região sul do Brasil. No presente trabalho, os mesmos produtos do mar foram analisados quanto ao teor das seguintes vitaminas: tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantotênico, riboflavina e piridoxina, através de métodos microbiológicos.

Material e Métodos

Amostras de pescados — Os peixes e crustáceos foram

* Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia da U.F.R.J. com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas.

** Bolsista da CAPES.

*** Endereço atual: Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

cedidos pelo Entreposto de Pesca de Santos. Foram estudadas as mesmas espécies analisadas em trabalho anterior[21].

Preparo das amostras — De cada espécie estudada, foram separados os filés, no mínimo de 10 exemplares, sendo uma parte submetida ao cozimento em água, a 100°C, por 15 minutos. Tanto a porção crua, como a cozida, foram moídas em moedor elétrico e conservadas em frascos de boca larga a - 20°C, até sua utilização nas experiências.

Dosagens microbiológicas de tiamina e biotina — Microrganismo utilizado: *Ochromonas danica,* cedida pelo Dr. Herman Baker, New Jersey College of Medicine and Dentistry, U.S.A. As dosagens foram feitas segundo Baker & Frank[1] e as amostras de pescados tratadas para extração das vitaminas segundo o método descrito por Kanasawa & col.[14].

Dosagens microbiológicas de ácido nicotínico, riboflavina, ácido pantotênico e piridoxina — Microrganismo utilizado: *Tetrahymena pyriformis,* também cedida pelo Dr. H. Baker. As dosagens e preparação extrativa foram feitas conforme as técnicas já citadas[1,14].

Em todas as dosagens, uma curva padrão foi feita para cada experiência, sendo que, para cada experiência, foram feitas cinco determinações.

Resultados

Os resultados obtidos foram expressos segundo a distribuição de cada vitamina nos produtos analisados.

Nos pescados estudados, o maior teor de tiamina foi encontrado na pescada cambucu. Através do processo de cozimento, observou-se baixa no teor da vitamina nos seguintes pescados: goete, pescada foguete, pescada cambucu, camarão rosa e camarão sete barbas. Valores maiores no produto cozido foram obtidos na sardinha e corvina (Tabela 1).

O maior teor de biotina foi encontrado em corvina. Através do processo de cozimento, observou-se a baixa no teor da vitamina em todos os produtos analisados, sendo que a corvina foi o pescado que apresentou maior perda (Tabela 2).

Tabela 2

Teor de biotina em peixes e crustáceos

Espécies	mg de biotina/100g de material seco*	
	Cru	Cozido
Sardinella aurita (sardinha)	0,047 (0,040/0,051)**	0,039 (0,031/0,049)
Micropogon furnieri (corvina)	0,103 (0,077/0,122)	0,058 (0,037/0,083)
Cynoscion petranus (goete)	0,036 (0,032/0,041)	0,035 (0,030/0,041)
Macrodon ancylodon (pescada foguete)	0,043 (0,037/0,050)	0,032 (0,029/0,033)
Cynoscion virescens (pescada cambucu)	0,034 (0,028/0,036)	0,031 (0,028/0,034)
Penaueus brasiliensis (camarão rosa)	0,041 (0,032/0,051)	0,030 (0,027/0,036)
Xiphopenaueus kroyeri (camarão sete barbas)	0,038 (0,032/0,041)	0,031 (0,029/0,031)

* Resultados referentes à média de 3 experiências
** Valores máximos e mínimos encontrados nas dosagens

Tabela 1

Teor de tiamina em peixes e crustáceos

Espécies	mg de tiamina/100g de material seco*	
	Cru	Cozido
Sardinella aurita (sardinha)	0,61 (0,50/0,71)**	0,68 (0,52/0,74)
Micropogon furnieri (corvina)	0,43 (0,29/0,72)	0,55 (0,41/0,74)
Cynoscion petranus (goete)	0,73 (0,46/1,01)	0,60 (0,34/0,92)
Macrodon ancylodon (pescada foguete)	0,66 (0,56/0,72)	0,56 (0,41/0,79)
Cynoscion virescens (pescada cambucu)	1,99 (1,55/2,25)	0,53 (0,39/0,68)
Penaueus brasiliensis (camarão rosa)	0,56 (0,30/0,71)	0,40 (0,22/0,65)
Xiphopenaueus kroyeri (camarão sete barbas)	0,78 (0,59/0,99)	0,72 (0,58/0,83)

* Resultados referentes à média de 3 experiências
** Valores máximos e mínimos encontrados nas dosagens

Tabela 3

Teor de ácido nicotínico em peixes e crustáceos

Espécies	mg de ácido nicotínico/100g de material seco*	
	Cru	Cozido
Sardinella aurita (sardinha)	18,54 (15,77/24,09)**	11,17 (8,94/12,66)
Micropogon furnieri (corvina)	5,36 (4,36/6,39)	2,60 (1,76/3,37)
Cynoscion petranus (goete)	3,78 (2,40/4,52)	3,21 (2,25/3,70)
Macrodon ancylodon (pescada foguete)	6,67 (5,60/7,21)	4,72 (4,01/5,81)
Cynoscion virescens (pescada cambucu)	6,38 (4,99/7,08)	2,74 (2,19/3,02)
Penaueus brasiliensis (camarão rosa)	5,64 (4,83/6,05)	3,14 (2,74/3,71)
Xiphopenaueus kroyeri (camarão sete barbas)	4,25 (4,01/5,25)	4,86 (4,08/5,81)

* Resultados referentes à media de 3 experiências
** Valores máximos e mínimos encontrados nas dosagens

O ácido nicotínico foi encontrado em maior quantidade na sardinha, sendo a quantidade da vitamina estimada bem menor nos outros produtos estudados. Após o cozimento, observou-se baixa no teor da vitamina nos seguintes produtos: sardinha, goete, pescada foguete, pescada cambucu e camarão rosa. Valores maiores no produto cozido foram obtidos no camarão sete barbas (Tabela 3).

A sardinha foi o pescado que apresentou maior teor de riboflavina. O cozimento causou baixa da vitamina em todos os produtos analisados, sendo que o goete apresentou maior perda (Tabela 4).

Tabela 4

Teor de riboflavina em peixes e crustáceos

Espécies	mg de riboflavina/100g de material seco*	
	Cru	Cozido
Sardinella aurita (sardinha)	4,23 (2,91/5,65)**	2,70 (2,37/2,97)
Micropogon furnieri (corvina)	1,96 (1,55/2,65)	1,58 (1,07/1,35)
Cynoscion petranus (goete)	3,30 (2,72/4,55)	1,51 (1,36/1,67)
Macrodon ancylodon (pescada foguete)	1,52 (1,16/1,89)	1,25 (0,85/1,85)
Cynoscion virescens (pescada cambucu)	1,52 (0,92/2,04)	1,36 (0,81/1,85)
Penaueus brasiliensis (camarão rosa)	2,17 (1,78/2,97)	1,80 (1,37/2,64)
Xiphopenaueus kroyeri (camarão sete barbas)	0,96 (0,67/1,41)	0,62 (0,34/0,68)

* Resultados referentes à média de 3 experiências

** Valores máximos e mínimos encontrados nas dosagens

O teor mais elevado de ácido pantotênico foi observado no goete. Nos outros materiais, a quantidade estimada foi menor. O cozimento causou baixa da vitamina em todos os produtos analisados (Tabela 5).

Os maiores valores de piridoxina foram encontrados em corvina. O cozimento provocou a perda de vitamina em todos os pescados estudados (Tabela 6).

Discussão

No presente trabalho, os peixes e crustáceos estudados demonstraram uma variação no teor de tiamina entre 0,43 a 1,99mg/100g de material seco. Com exceção da sardinha e corvina, os demais produtos apresentaram perda de vitamina que variou de 8 a 74% (Tabela 1). Os valores obtidos foram superiores aos encontrados em outros produtos marinhos[4,8,13,15,16,18,19]. De acordo com Maurício[19], o teor de tiamina para a sardinha, corvina e camarão é, respectivamente, 0,22, 0,04 e 0,15mg%. Para os mesmos produtos, encontramos valores de 0,61, 0,43 e 0,56mg%. Provavelmente, as divergências de resultados são devidas às diferenças de métodos utilizados para a dosagem de tiamina, sendo importante ressaltar a ausência de detalhes sobre a metodologia empregada nos trabalhos consultados[8,19]. Valores comparativos aos obtidos no presente trabalho foram relatados em algas marinhas[17]. O teor de tiamina, determinado em sardinha e corvina, foi maior após estes peixes terem sido cozidos (Tabela 1). Estes resultados poderiam ser explicados pela presença de tiaminase nesses pescados. A tiaminase foi primeiramente demonstrada em peixes de água doce[7], sendo posteriormente detectada em peixes marinhos[6,11]. Esta enzima que seria inativada com o processo do cozimento, agiria no produto "in natura", pois, durante o descongelamento dos pescados, na fase de preparo das amostras, as mesmas eram conservadas por certo período de tempo — 8 a 14 horas — à temperatura ambiente. A termolabilidade da tiaminase foi determinada por Sealock & col.[22].

Dos produtos analisados, a corvina apresentou o maior teor de biotina (0,103mg%), sendo este valor menor somente aos encontrados em fígado de carneiro (0,127mg%), levedura (0,200mg%) e geléia real (0,410mg%), e comparativamente maior que os encontrados em cereais, frutas, vegetais e laticínios[10]. Gyorgy & Langer[10] encontraram valores semelhantes aos nossos para sardinha (0,024mg%), cavala (0,018 mg%) e salmão (0,015mg%). Os valores determinados por Loughlin & Teeri[17] foram menores que os obtidos no presente trabalho.

O teor de ácido nicotínico determinado variou entre 3,78 a 18,54mg% (Tabela 3). Com exceção da sardinha, que apresentou um teor de 18,54mg%, os demais valores obtidos foram abaixo de 7,0mg%. Nossos resultados são coincidentes com os relatados na literatura[13,18,19,26]. O alto valor de ácido nicotínico, obtido para sardinha (18,54mg%), é comparável ao determinado em outros alimentos, tais como amendoim cru (18,80mg%), carne de boi desidratada (17,90mg%) e fígado de ovelha (17,20mg%)[8]. Com exceção do camarão sete barbas, todos os outros produtos sofreram perdas através do cozimento. Análogos do ácido nicotínico, como a homarina (metil ácido picolínico), foram detectados em invertebrados[9,25]. A trigonelina (N-metilbetaína do ácido nicotínico) foi demonstrada em siri e lagostas[2] e em moluscos marinhos comestíveis[12]. A quantidade ligeiramente superior de ácido nicotínico, no camarão sete barbas submetido ao cozimento, poderia ser explicada por uma transformação pirogênica da trigonelina em ácido nicotínico, como foi sugerido por Daum[5], que determinou maior quantidade da vitamina em café torrado, quando comparado com café não torrado.

Os valores encontrados para riboflavina variaram entre 0,96 a 4,23mg% sendo o processo de cozimento responsável pela perda da vitamina em todos os produtos analisados (Tabela 4). O conteúdo de riboflavina, em produtos marinhos, relatado na literatura, é menor que os determinados no presente trabalho[4,13,18,26]. Os valores médios, por nós obtidos, são semelhantes aos encontrados nos estudos do teor desta vitamina em pirarucu salgado[3]. O teor de riboflavina, encontrado na corvina (1,96mg%), situa-se como valor médio, em relação a valores obtidos por outros autores: 0,14mg%[19] e 36,30mg%[27]. Esses resultados conflitantes podem ser devidos às diferenças no preparo das amostras para extração da vitamina ou mesmo na diversidade dos métodos de dosagens utilizados.

A quantidade de ácido pantotênico variou de 4,80 a 9,17 mg% nos produtos analisados, sendo que o cozimento determinou uma perda da vitamina em todos os pescados (Tabela 5). Nossos resultados são comparativamente maiores do que os obtidos por outros autores[17,18]. Quantidades semelhantes de ácido pantotênico, determinadas no presente trabalho, foram obtidas, também por métodos microbiológicos, em algas marinhas (4,30mg%)[14].

Os resultados expressos para o teor de piridoxina incluem os outros compostos do grupo da vitamina B_6 — piridoxamina e piridoxal —, pois *T. pyriformis* utiliza as três formas da vitamina, sendo essas utilizadas em conjunto, para determinação da curva padrão para a dosagem de vitamina B_6. O teor desta vitamina variou, nos produtos analisados, de 0,97 a 1,50mg%, sendo que o cozimento provocou perda da vitamina em todos os pescados estudados (Tabela 6). Os resultados obtidos são maiores que os relatados para outros peixes[20] e algas marinhas[14]. No trabalho de Meder & Wiss[20] podemos observar, claramente, diferenças nos valores encontrados para o mesmo produto, devido, provavelmente, à utilização de diferentes métodos de dosagens.

Em nosso trabalho, verificamos que a maioria dos pescados sofre perda de vitaminas através do cozimento. Esse fato deve ser levado em consideração em programas de alimentação onde esses produtos são submetidos a alta temperatura. A aplicação de métodos microbiológicos, como os empregados no presente trabalho, podem contribuir valiosamente para o conhecimento do valor nutritivo de nossos alimentos.

Tabela 5

Teor de ácido pantotênico em peixes e crustáceos

Espécies	mg de ácido pantotênico/100g de material seco*	
	Cru	Cozido
Sardinella aurita (sardinha)	6,43 (5,62/7,02)**	5,16 (4,47/5,87)
Micropogon furnieri (corvina)	7,38 (5,73/8,69)	4,41 (3,43/4,91)
Cynoscion petranus (goete)	9,17 (7,22/10,15)	5,42 (4,88/5,69)
Macrodon ancylodon (pescada foquete)	5,80 (3,57/6,25)	3,92 (3,42/4,29)
Cynoscion virescens (pescada cambucu)	5,10 (2,98/5,92)	4,38 (2,24/6,94)
Penaueus brasiliensis (camarão rosa)	4,80 (2,98/5,92)	3,36 (1,97/5,52)
Xiphopenaueus kroyeri (camarão sete barbas)	6,10 (4,08/9,18)	5,23 (3,51/7,81)

* Resultados referentes à média de 3 experiências
** Valores máximos e mínimos encontrados nas dosagens

Tabela 6

Teor de piridoxina em peixes e crustáceos

Espécies	mg de piridoxina/100g de material seco*	
	Cru	Cozido
Sardinella aurita (sardinha)	1,45 (1,17/1,76)**	0,92 (0,78/1,04)
Micropogon furnieri (corvina)	1,50 (1,41/1,55)	1,08 (1,03/1,16)
Cynoscion petranus (goete)	1,24 (0,95/1,31)	1,01 (0,81/1,31)
Macrodon ancylodon (pescada foguete)	1,03 (0,81/1,23)	0,72 (0,43/1,14)
Cynoscion virescens (pescada cambucu)	0,97 (0,53/1,41)	0,78 (0,43/1,14)
Penaueus brasiliensis (camarão rosa)	1,14 (0,98/1,31)	0,84 (0,72/0,96)
Xiphopenaueus kroyeri (camarão sete barbas)	0,99 (0,79/1,26)	0,84 (0,65/1,03)

* Resultados referentes à média de 3 experiências
** Valores máximos e mínimos encontrados nas dosagens

Referências Bibliográficas

1. BAKER, H. & FRANK, O. — Clinical Vitaminology, 198 p., New York, John Wiley & Sons, 1968.
2. BEERS, J.R. — The species distribution of some naturally occuring quaternary ammonium compounds. *Comp. Biochem. Physiol.*, 21:11-21, 1967.
3. CRAMER, E.R.; CARVALHO, M.C. & SALGADO, D. V. — Valor vitamínico de alimentos brasileiros. Coleção Estudo e Pesquisa Alimentar, SAPS, 166 p., Rio de Janeiro, 1964.
4. CRAVIOTO, R.O.; MASSIEN, H.G.; GUZMAN, J.G. &

CALVO DE LA TORRE, J. — Composición de alimentos mexicanos. *Ciência,* 11:129-155, 1951.

5. DAUM, M.G. — La niacina en el café y sua importancia nutricional na Venezuela. *Arch. venez. Nutr.,* 6:61-70, 1955.

6. DAUM, M.G. & JAFFÉ, W.G. — Estudio de la tiaminasa en peces marinos venezolanos en especial la sardina. *Arch. venez. Nutr.,* 7:153-162, 1956.

7. DEUTSCH, H.F. & HASLER, A.D. — Distribution of vitamin B_1 destructive enzymes in fish. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.,* 53:63-65, 1943.

8. FRANCO, G. — Teor vitamínico dos alimentos, 141 p., Rio de Janeiro, José Olympio Ed., 1968.

9. GASTEIGER, E.L.; HAAKE, P.C. & GERGEN, J.A. — An investigation of the distribution and function of homarine (N-methyl picolinic acid). *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 90:622--636, 1960.

10. GYORGY, P. & LANGER, B.W. Jr. — Occurrence in foods — Biotin, pp. 262-359, *In* SEBRELL, Jr. W.H. & HARRIS, R.S. (eds.) The Vitamins, Vol. II, New York, Academic Press, 1968.

11. HILKER, D.M. & PETER, O.F. — Anti-thiamine activity in Hawaii fish. *J. Nutr.,* 89:419-421, 1966.

12. HILTZ, D.F. — Occurrence of trigonelline (N-methyl nicotinic acid) in the adductor muscle of Lamellibranch, the Sea Scallop (*Placopecten magellanicus*). *J. Fishery Res. Bd. Canada,* 27:604-606, 1970.

13. JAFFÉ, W.G.; NOLBERGA, B.; EMBDEN, C.; GARCIA, S.; OLIVARES, H. & GROSS, M. — Composición de pescados venezolanos. *Arch. venez. Nutr.,* 7:163-166, 1956.

14. KANASAWA, A.; SAITO, A. & IDLER, D.R. — Vitamins B in Dulse (*Rhodymenia palmata*). *J. Fishery Res. Bd. Canada,* 23:915-916, 1966.

15. KENNEDY, T.S. & LEY, F.J. — Studies on the combined effect of gamma radiation and cooking on the nutritional value of fish. *J. Sci. Fd. Agric.,* 22:146-148, 1971.

16. LANDGRAF, R.G. Jr. — Technical note 27 Allaska Pollock: Proximate composition: amino acid, thiamine and riboflavin content use as mink feed. *Commun. Fishery Rev.,* 15:20-22, 1953.

17. LOUGHLIN, M.E. & TEERI, A.E. — Nutritive value of fish: biotin, folic acid, panthotenic acid and free amino acids of various salt-water species. *Food Res.*, 25:479-483, 1960.

18. MARCH, B.E.; BIELY, J.; BLIGH, E.G. & LANTZ, A. W. — Composition and nutritive value of meals from Alewife, Sheepshead, Maria, and Tullibee. *J. Fishery Res. Bd. Canada,* 24:1291-1298, 1967.

19. MAURÍCIO, H.V. — Pesca e alimentação no Brasil I — Pesca e sua importância alimentar. *Arch. bras. Nutr.,* 16:49-63, 1962.

20. MEDER, H. & WISS, O. — Ocurrence in foods — Vitamin B_6 group. pp. 2-119, *In* SEBRELL, W.H. Jr. & HARRIS, R.S., (eds). The Vitamins, Vol. II, New York, Academic Press, 1968.

21. RIBEIRO, S. & ROITMAN, I. — Dosagens microbiológicas de vitaminas em peixes e crustáceos. I — ácido fólico, colina e vitamina B_{12}. *Rev. Microbiol.,* 3:79-84, 1972.

22. SEALOCK, R.R.; LIVERMORE, A.H. & EVANS, C.A. — Thiamine inactivation by the fresh-fish or Chastek paralysis factor. *J. Amer. chem. Soc.,* 65:935-940, 1943.

23. SILVA, B.L.; FONSECA, H.P.; ROCHA, M.; CARVALHO, M.C.; CARVALHO, E.; BREVES, G.; BURGER, O. & PINHEIRO, J. — Valor nutritivo de alguns peixes brasileiros. Coleção Estudo e Pesquisa Alimentar, SAPS, 38 p., Rio de Janeiro, 1954.

24. TARR, H.L.A. & COMER, A.G. — Nucleotides and related compounds, sugar and homarine in shrimp. *J. Fishery Res. Bd. Canada,* 22:307-311, 1965.

25. TEERI, A.E.; LOUGHLIN, M.E. & JOSSELYN, D. — Nutritive value of fish. I — nicotinic acid, riboflavin, vitamin B_{12} and amino acid of various salt-water species. *Food Res.,* 22:145-150, 1957.

26. WANATABLE, K. — Variations in chemical composition in some commercial fishes from the south of Brazil. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fishery,* 29:469-474, 1963.

Agar eosina-azul de metileno modificado para inibição do crescimento invasor de *Proteus* spp.*

Elsa F. Rodrigues de Oliveira, João Ramos Costa Andrade, Alexandre Adler Pereira & Italo Suassuna

Resumo

Em face aos resultados favoráveis, obtidos com a inibição do "swarming" em *Proteus* spp , com o meio "agar azul de bromotimol-lactose-cistina", "Brolacin", Merck, foi investigada a modificação do meio "agar-azul de metileno" (EMB agar) para o mesmo fim, devido seu melhor rendimento quanto à diferenciação colonial de bactérias coliformes. Resultados satisfatórios foram obtidos com o EMB agar pela omissão de extrato de carne e de cloreto de sódio (como a principal fonte de eletrólitos) e pela adição de L-cistina, na concentração de 128 mg por cento. Os resultados foram comparados aos obtidos com o meio comercial "Brolacin", revelando-se o EMB agar modificado superior não somente na diferenciação colonial, como na inibição do "swarming".

Summary

A modified eosin-methylene blue agar to inhibit swarming of Proteus spp

The use of "Bromothymolblau-Lactose-Cystine-Agar" (Elektrolytarm), "Brolacin" (Merck) as applied to enteric bacteriology, revealed favorable results in inhibiting the swarming of *Proteus* species. The differentiation among coliform bacteria by colonial appearance, however, was not so rewarding. A modification of Eosin-Methylene Blue (EMB) agar yielded satisfactory results by exclusion of beef extract and sodium chloride, and addition of 128 mg per cent of cystine instead. A comparison of both modified and unmodified media by using strains of Enterobacteriaceae, including swarming strains of *Proteus mirabilis* or *P. vulgaris,* demonstrated superior results with the modified EMB agar as related both to colonial differentiation and swarming inhibition.

Introdução

Quando espécies de *Proteus* que exibem "swarming" ocorrem em material de composição polimicrobiana, torna-se difícil, em inúmeros casos, o isolamento e identificação de outros germes associados. Isto é bastante freqüente em espécimes de feridas infectadas[12], secreções otológicas[4], urina[9], fezes e outros materiais de origem variada[2,6,7].

Numerosos estudos procuraram esclarecer o fenômeno de "swarming" em *Proteus*. Inicialmente, os estudos de Moltke[22] e Russ-Münzer[24] admitiram a influência de alterações nutritivas na produção de "swarming" secundário à ação de agentes tóxicos produzidos pelo crescimento do próprio microrganismo. Klineberger-Nobel[16] e Hughes[15] descreveram as diversas etapas do "swarming".

Motivados pelas dificuldades surgidas na prática diária, outros estudos pretenderam a supressão do fenômeno, recorrendo a métodos químicos, físicos ou biológicos. Entre os processos físicos utilizados, encontra-se a redução da umidade, com aumento da sua concentração salina[13]. Fry[11] utilizou técnica adaptada de processos de anaerobiose, consistindo na adição de camada de agar sobre a superfície do meio recém-semeada. Tal processo apresenta o inconveniente de colônias bacterianas serem obtidas apenas em profundidade. Outro recurso consiste na adição de excesso de agar ao meio de cultura, para obtenção de gel mais duro[12]. Entre os processos baseados no emprego de substâncias químicas, pode ser citada a adição de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ao meio de cultura[28], de paranitrofenil-glicerina (PNPG)[29,30] e de carvão ativado[23]. Além destes, vários outros métodos são encontrados na literatura[14,17,18,19].

A eficácia dos processos acima citados foi do mais variado jaez, obtendo-se, ao lado de inibição

* Serviço de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado da Guanabara, Rua Teodoro da Silva, 48, 20000 Rio de Janeiro, GB, Brasil.

parcial ou total do "swarming" em *Proteus,* efeitos indesejáveis, tais como: inibição parcial ou total do crescimento de germes associados, modificações na morfologia colonial, hemólise do sangue nos meios usados e, até mesmo, inibição do crescimento dos próprios representantes de *Proteus.*

Entre os métodos biológicos, a inibição do "swarming" é feita pela adição, ao meio, de antissoro polivalente de *Proteus*[3]. Devido à grande variedade de sorotipos existentes, surgem ocasionalmente amostras cujo "swarming" não é inibido por essa técnica. Além disso, é recurso tecnicamente oneroso.

Naylor[22] e Schneierson[26] constataram bons resultados com a omissão de eletrólitos do meio de cultura. Sandys[25] concluiu que a inibição era independente da baixa pressão osmótica decorrente da deficiência eletrolítica. Em continuação a estudos anteriores, Naylor[22] elaborou meio de cultura pobre em eletrólitos obtendo não só inibição do "swarming" em *Proteus* como também o crescimento das demais espécies bacterianas, inclusive as gram-positivas. Sandys[25] aperfeiçoou o meio, adicionando-lhe o indicador azul de bromotimol para melhor diferenciação colonial. Baseado neste princípio, foi lançado, recentemente, o meio "agar azul de bromotimol-lactose-cistina" ("Brolacin", Merck), avaliado na presente comunicação.

Visando ampliar os recursos referentes ao isolamento de bactérias gram-negativas em culturas mistas contendo *Proteus*, propõe-se a elaboração de um meio seletivo-indicador, no qual a inibição do "swarming" em *Proteus* ficasse associada a condições de crescimento e diferenciação colonial satisfatórias para as demais bactérias gram-negativas. Para tal, pareceu indicado o meio "agar eosina-azul de metileno" (EMB Agar), largamente utilizado por sua ação seletiva para bactérias gram-negativas e pela excelente diferenciação colonial demonstrada em relação a espécies de coliformes que nele proliferam.

Material e Métodos

Foram utilizados, no ensaio, o meio "agar azul de bromotimol-lactose-cistina", que corresponde ao "Bromothymolblau-Lactose-Cystin-Agar (Elektrolytarm)" da Merck, o meio EMB agar, preparado de maneira tradicional[27] e o último meio, modificado, tentativamente preparado de três diferentes formas, a partir da fórmula básica, citada a seguir: peptona bacteriológica Geyer, 10g; agar BBL, 15g; solução de eosina Y (3%), 13,5mℓ; solução de lactose (10%), 50mℓ; solução de azul de metileno (0,5%), 16mℓ; água destilada, q.s.p., 1000mℓ.

A uma das partidas, foi adicionado extrato de levedura (Difco), na concentração de 0,5%; e, à outra, cloridrato de L-cistina a 128mg%. Os meios foram autoclavados a 120°C, por 20 minutos. Quando distribuídos em placas de Petri, foram deixados à temperatura ambiente, durante uma noite, para eliminar a água de condensação.

Foram utilizadas 41 amostras de *Proteus mirabilis* produtoras de "swarming" e quatro amostras não-produtoras. Para avaliar a capacidade do meio EMB, modificado pela adição de cistina, em permitir crescimento bacteriano satisfatório de outras espécies, sem alteração das características coloniais, foram usadas 185 amostras de microrganismos gram-negativos intestinais, 104 recentemente isoladas de material clínico (urina, sangue, fezes e secreções) e as demais obtidas de coleção já existente. As 185 amostras são citadas, seguidas do número total de amostras de cada espécie e, entre parênteses, o número correspondente às amostras isoladas de material clínico: *Escherichia coli* 35 (30); *Shigella* sp 3 (2); *Shigella sonnei* 1; *Shigella flexneri* 3; *Shigella dysenteriae* 1; *Edwardsiella* sp 1; *Salmonella* sp 7 (4); *Salmonella typhi* 3; *Salmonella typhimurium* 3; *Arizona* sp 3; *Citrobacter* sp 10 (9); *Citrobacter freundii* 8; *Citrobacter diversus* 1; *Klebsiella* sp (9); *Enterobacter* sp 23 (22); *Enterobacter aerogenes* 2; *Enterobacter liquefaciens* 3; *Enterobacter colacae* 5; *Enterobacter hafniae* 3; *Enterobacter agglomerans* 1; *Serratia* sp 2; *Serratia marcescens* 1; *Proteus mirabilis* 18 (15); *Proteus morganii* 12 (9); *Proteus vulgaris* 5 (3); *Proteus rettgeri* 8 (1); *Providencia* sp 4; *Pseudomonas* sp 1; *Pseudomonas aeruginosa* 3.

As amostras provenientes de coleção foram obtidas do Serviço de Microbiologia e Imunologia da Universidade do Estado da Guanabara (MI-UEG), exceto as amostras de *Edwardsiella* sp, *Citrobacter diversus* e *Enterobacter agglomerans,* obtidas de outras coleções.

Todas as amostras de *Proteus*, destinadas a avaliar a inibição do "swarming", foram semeadas em caldo nutritivo, incubadas a 37°C por uma noite e plaqueadas por técnica de esgotamento. Após incubação em estufa bacteriológica, por 24 horas, realizava-se a leitura. As amostras destinadas à avaliação do crescimento e morfologia colonial foram plaqueadas em meio EMB modificado, adicionado de cistina, a partir de inóculo obtido de crescimento em agar simples inclinado, após incubação a 37°C, por 24 horas. Uma vez semeadas, por técnica de esgotamento, as placas eram deixadas em estufa bacteriológica, para leitura no dia seguinte.

A anotação dos resultados, no que se refere ao "swarming" de *Proteus,* baseou-se no seguinte critério: colônias isoladas, sem espraiamento (0); colônias isoladas, com ligeiro espraiamento (+); colônias isoladas, com predominância de "swarming" (++) e "swarming" confluente (+++).

Para indicação do crescimento do *Proteus* e outras espécies bacterianas utilizadas, adotou-se o critério do diâmetro aproximado das colônias que se desenvolve-

ram nos meios testados. Considerou-se: crescimento bom (2-3mm diâm.), regular (1mm diâm.) e mau (colônias puntiformes). A morfologia colonial foi sempre comparada com a obtida no meio EMB original.

Foram semeadas sete amostras de *Proteus* produtoras de "swarming" intenso, uma dotada de "swarming" discreto e quatro não-produtoras. Os meios utilizados foram o EMB agar original, o meio "agar azul de bromotimol-lactose-cistina", o EMB agar destituído de eletrólitos e, ainda, o mesmo meio com cistina ou adicionado de extrato de levedura. As demais amostras foram semeadas apenas no meio EMB original e no meio EMB sem eletrólitos adicionado de cistina, além do meio "agar azul de bromotimol-lactose-cistina".

Resultados

As experiências iniciais, com número limitado de amostras de *Proteus*, permitiram evidenciar que o EMB sem eletrólitos não proporcionava bom crescimento, apesar de inibir intensamente o "swarming". O meio EMB sem eletrólitos, adicionado de extrato de levedura, corrigia a deficiência nutritiva, porém permitia o crescimento invasor de *Proteus,* havendo, mesmo, exaltação do "swarming" quando comparado com o meio EMB original.

Por outro lado, o EMB agar sem eletrólitos, adicionado de cistina, mostrou inibição satisfatória do "swarming", associado a um bom crescimento das amostras. Os resultados obtidos com o meio EMB original (com eletrólitos e sem cistina) e com o meio comercial ("Brolacin", Merck), destinado ao mesmo propósito, estão referidos na Tabela 1.

Como pode ser observado, obteve-se, no meio EMB sem eletrólitos e adicionado de cistina, inibição parcial do "swarming" em três das 41 amostras testadas, e inibição total nas restantes. Em um caso, não houve crescimento bacteriano; em outro, não houve inibição do "swarming". Em comparação, no meio "agar azul de bromotimol-lactose-cistina", a inibição foi parcial em 20 amostras, total em 10 e ausente em sete.

O crescimento dos demais microrganismos foi satisfatório. A morfologia colonial em nada diferiu da obtida no meio EMB original, quando considerado o meio modificado.

Discussão

O meio modificado, a partir do EMB agar, associa as vantagens de (a) boa diferenciação colonial de coliformes e outras enterobactérias, (b) intensa inibição do "swarming" em *Proteus* e (c) após adição de

Tabela 1

Comparação de EMB Agar, EMB Agar sem eletrólitos adicionado de cistina, e agar azul de bromotimol-lactose-cistina ("Brolacin"), quanto ao crescimento e produção de "swarming" de *Proteus mirabilis*.

Amostras de *P. mirabilis*	Agar azul de bromotimol lactose-cistina		EMB Agar		EMB Agar cistina	
	I	II	I	II	I	II
1	B	+	B	+	não cresceu	
2	B	0	B	0	B	0
3	B	0	B	0	B	0
4	B	+	B	++	B	+
5	B	++	B	+++	B	+
6	B	++	B	+++	B	++
7	B	0	B	+++	B	0
8	B	+	B	+++	B	0
9	B	0	B	+++	B	0
10	B	+	B	+++	B	0
11	B	0	B	+++	B	0
12	B	++	B	+++	B	0
13	B	0	B	+++	B	0
14	B	+	B	+++	B	0
15	B	+++	B	+++	B	0
16	B	0	B	+++	B	0
17	B	0	B	+++	B	0
18	B	+	B	+++	B	0
19	B	+	B	+++	B	0
20	B	0	B	+++	B	0
21	B	+	B	+++	B	0
22	B	+++	B	+++	B	0
23	B	++	B	+++	B	0
24	B	+	B	+++	B	0
25	R	0	B	+++	R	0
26	B	0	B	+++	B	0
27	B	0	B	+++	B	0
28	B	+	B	+++	B	0
29	B	+++	B	+++	B	0
30	B	++	B	+++	B	0
31	B	+++	B	+++	B	0
32	B	+	B	+	B	0
33	B	++	B	+++	B	0
34	B	+++	B	++	R	0
35	B	+++	B	+++	B	0
36	B	++	B	+++	B	0
37	B	+	B	+++	B	0
38	B	0	B	0	B	0
39	B	0	B	0	B	0
40	B	+++	B	+++	B	0
41	B	+	B	+++	R	0
42	B	+++	B	+++	B	+++
43	B	++	B	+++	B	0
44	B	+	B	+	B	0
45	B	++	B	+++	B	0

I — crescimento B — bom
R — regular
M — mau

II — "swarming"
0 — colônias isoladas, sem "swarming"
+ — colônias isoladas, ligeiro "swarming"
++ — colônias isoladas, predominância de "swarming"
+++ — "swarming" confluente

cistina, boas condições de crescimento para os germes testados. A superioridade desse meio sobre o "agar azul de bromotimol-lactose-cistina" poderia ser explicada pela menor concentração salina em sua composição, decorrente da omissão do extrato de carne em sua fórmula. Além disso, não foi avaliado até que ponto os corantes utilizados no EMB agar agiriam sinergicamente com a pobreza de eletrólitos, no sentido de maior eficácia na inibição do "swarming".

A exaltação do "swarming", por adição de extrato de levedura, já havia sido anteriormente observada por Brogen, em 1971, que atribuiu tal efeito à fração glicopeptídica do extrato.

Tendo em vista a seletividade do meio modificado, sua indicação corresponde à do meio original, isto é, para o isolamento apenas de bactérias gram-negativas. Cumpre destacar sua indicação em esquemas de coprocultura, para isolamento de patogênicos intestinais. É fato constatado a ação inibidora exercida por meios altamente impedientes sobre amostras de *Salmonella* e *Shigella*[5,8]. Considerando-se a grande incidência de *Proteus*, especialmente em distúrbios intestinais[1], confirma-se assim a necessidade de meio pouco impediente, que permita o bom desenvolvimento das espécies patogênicas, sem interferência do "swarming" de *Proteus* porventura existente no material.

Em urinas, pela freqüência de isolamentos de bactérias gram-negativas[10], justifica-se plenamente o emprego de um meio seletivo indicador. Além disso, não é rara a presença de *Proteus* em associação com outras espécies bacterianas[9], sendo de observação comum que, freqüentemente, como contaminante, origine erros de contagem desta ou de outras bactérias no espécime, podendo mesmo ocultar a presença do agente causal. Em infecções urinárias, o meio proposto permite rápida presunção da ocorrência de germes do grupo coliforme, com base na morfologia colonial, como no EMB original, diferenciando-os entre os membros de *Escherichia* e *Klebsiella-Enterobacter*, os quais provavelmente admitem indicações terapêuticas diversas[10].

Há que considerar ainda que, de maneira geral, as bactérias gram-negativas vêm adquirindo importância crescente nas patologias infecciosas, desde a introdução dos antimicrobianos de amplo espectro, citostáticos e corticóides. Em dados citados por Yow[31], observa-se o aumento de 24% nas taxas de isolamento de *Proteus* de material de diversas origens, em período de aproximadamente três anos. Confirma-se assim, mais uma vez, a necessidade da utilização de meios que, quanto à participação deste gênero, possibilitem o diagnóstico bacteriológico rápido e preciso.

Referências Bibliográficas

1. ABUASSI, W.L.; SUASSUNA, I.; MOTA, J.M.; SILVA, M. & SUASSUNA, I.R. — Investigação sobre a etiologia bacteriana e o tratamento das gastroenterites agudas na primeira infância. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo,* 13:18-27, 1971.
2. AMBROSE Jr., S.S. & TAYLOR, W.W. — A study of the etiology, epidemiology and therapeutics of non-gonococcal urethritis. *Amer. J. Syph.*, 37:501-513, 1953.
3. BEATTIE, M.K. — A method for the inhibition of swarming of *B. Proteus. J. Pathol.,* 57:388-389, 1945.
4. BOLAÑOS, R. — Estudio bacterilogico en las otites cronicas infantiles. *Rev. Biol. trop.,* 6:79-85, 1958.
5. BRAIDE, M. de A.; SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I.R. — Inibição do crescimento de *Salmonella* e *Shigella* em agar S.S. *Cien. e Cult.,* 19:457-458, 1967.
6. BRET, A.; TAPIE, M. & DURIEUX, P. — Contribution à l'étude des infections neo-natales, infections vaginales a *Proteus,* vaginites a *Proteus. Presse méd.,* 68:2091-2092, 1960.
7. CAUDURO, P.F. — Exame bacteriológico de material proveniente das vias biliares. *Rev. bras. Med.,* 13:826-828, 1956.
8. COSTA, A.G.; SCORZELLI Jr., A.; SUASSUNA, I.R.; SUASSUNA, I. & GÓES, P. — Comparação de meios seletivo-indicadores e de enriquecimento usados no isolamento de enterobactérias patogênicas. *An. Microbiol., Rio de J.,* 5:239-303, 1957.
9. EDEBO, L. & LAURELL, G. — Hospital infection of the urinary tract with *Proteus. Acta pathol. microbiol. scand.,* 43:93-195, 1958.
10. FAGUNDES, C.F.; REICH, F.D.; BORGES, W.S. & SALAZAR, H.C. — Resistência microbiana em infecções urinárias ocorridas em um hospital geral universitário. *Rev. Med. Est. Guanabara,* 38:15-27, 1971.
11. FRY, R.M. — Isolation of organisms in the presence of *Proteus. Brit. J. exp. path.*, 13:456-457, 1932.
12. HAYWARD, N.J. & MILES, A.A. — Inhibition of *Proteus* in cultures from wounds. *Lancet,* 2:116-117, 1943.
13. HILL, J.H. & WHITE, E.C. — The use of sodium chloride in culture media for the separation of certain gram-positive cocci from gram-negative bacilli. *J. Bact.,* 18:43-57, 1929.
14. HOLMAN, R.A. — The use of sulphonamides to inhibit the swarming of *Proteus. J. Path. Bact.*, 73:91-98, 1957.
15. HUGHES, W.H. — A reconsideration of the swarming of *Proteus vulgaris. J. gen. Microbiol.,* 17:49-58, 1957.
16. KLINEBERGER-NOBEL, E. — Morphological appearances of various stages of *Bacillus Proteus* and coliforms. *J.Hyg.,* 45:410-412, 1947.
17. KRAMER, E. & KROCH, F.E. Hemmung des Schwarmens des *Proteus*-kolonien durch Chlorahydrat. *Zbl. Bakt.,* 120:462-464, 1931.

18. LE GAC, P.; COURMES, E. & BRES, P. — Note sur l'emploi du millieu de Sabouraud pour inhiber la formation dun voie par les *Proteus* envahissants. *Bull. Soc. Path. exot.*, 48:24-26, 1955.

19. LICHSTEIN, H.C., & SNYDER, M.L. — The inhibition of the spreading growth of *Proteus* and other bacteria to permit the isolation of associated *Streptococci. J. Bact.*, 42:653-663, 1941.

20. LOMINSKI, I. & LENDRUM, A.C. — The mechanism of swarming of *Proteus*. *J. Path. Bact.*, 59:688-691, 1947.

21. MOLTKE, R.J. & MACLEAN, F.I. — The nature and contribution to the characterization and systematic classification of bacteria *Proteus vulgaris.* Copenhagen, Levin and Muksgaard, 1927.

22. NAYLOR, P.G.D. — A simple medium which controls the swarming of *Proteus. J. med. Lab. Technol.*, 17:182--184, 1960.

23. REYN, A. — Recent developments in the laboratory diagnosis of gonococcal infections. *Bull. Wld Hlth Org.*, 40:245-255, 1967.

24. RUSS-MUNZER, A. — Das scharmphanomen dei *Bacillus Proteus. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 133:214-223, 1935.

25. SANDYS, G.H. — A new method of preventing swarming of *Proteus* sp. with description of a new medium suitable for use in routine laboratory practice. *J. med. Lab. Technol.*, 17:224-233, 1960.

26. SCHNEIERSON, S.S. — Production of discret non--swarming colonies by *Proteus* on medium deficient in sodium chloride and other salts. *J. Bact.*, 82:621-622, 1961.

27. WADSWORTH, A.B. — Standard Methods. New York State Department of Health. Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1947.

28. WEISER, R. & WIMPENNY, J.C. — Inhibition by ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) of the swarming of *Proteus mirabilis. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 218:434--436, 1971.

29. WILLIAMS, F.D. — Abolition of swarming of *Proteus* by p-nitro-phenyl glicerin: general properties. *Appl. Microbiol.*, 25:745-750, 1973.

30. WILLIAMS, F.D. — Abolition of swarming of *Proteus* by p-nitro-phenyl glicerin: application to blood agar media. *Appl. Microbiol.*, 25:751-754, 1973.

31. YOW, E.M. — Development of *Proteus* and *Pseudomonas* infections during antibiotic therapy. *J. Amer. med. Ass.*, 149:1184-1188, 1952.

Isolamento e incidência do parvovírus bovino no Brasil*

Fúlvio José Alice**

Resumo

Um vírus, isolado de material fecal de um bezerro, mediante inoculação em cultura de rim de feto da mesma espécie animal (RFB), mostrou-se filtrável em vela Berkefeld W e resistente ao éter etílico. Hemaglutinou e hemadsorveu apenas eritrócitos de origem humana, tipo "O" e de cobaio. Cobaios, coelhos, camundongos adultos e neonatos e aves, inoculados por diferentes vias, não revelaram manifestações clínicas aparentes. Não houve proliferação do vírus em embriões de galinha inoculados pela via alantóide. O vírus proliferou satisfatoriamente apenas em RFB, mas não nos demais sistemas celulares ensaiados que incluiram: LLC-MK 2, BHK-21, IB-RS-2 e TB-IBB. Provas cruzadas de neutralização e de inibição da hemaglutinação revelaram que o vírus isolado se relaciona, sorologicamente, com a cepa HADEN do parvovírus bovino. Inquérito sorológico, com 621 amostras de soro bovino, procedentes de vários Municípios dos Estados de Bahia, Rio de Janeiro, Guanabara e São Paulo, sugeriram larga disseminação do vírus. Nos 28 plantéis examinados, existiam animais com anticorpos inibidores da hemaglutinação, cujo percentual variou de 10-89%. No cômputo geral, 66,5% das amostras examinadas revelaram títulos HI iguais ou superiores a 1:20.

Summary

Isolation and incidence of bovine parvovirus in Brazil

A virus was isolated from fecal matter of a calf on bovine fetal kidney culture. The virus is ready filterable through Berkefeld W candle, resists ethyl ether treatment, hemadsorbs and hemagglutinates only human and guinea pig erythrocytes. Inoculations into guinea pigs, rabbits, cockerels, adult and suckling mice caused no apparent signs of sickness. There was no evidence of growth in chicken embryos inoculated by allantoic cavity. The virus replicates in BFK cultures, but no replication occurred in the line cells LLC-MK 2, BHK-21, IB-RS-2 and TB-IBB (bovine fetal testis). Cross neutralization and hemagglutination inhibition tests showed that the virus was serologically related to the HADEN strain of bovine parvovirus (BPV). It seems that the virus has a high prevalence amongst the cattle population. In a serologic survey, 621 bovine blood serum samples from the States of Bahia, Guanabara, Rio de Janeiro and São Paulo were examinated for HI antibodies. Of the total serums tested, 66.5% had HI antibody titers 1:20 or greater. HI antibodies were found in all 28 herds tested, whose frequency in infected herds varied from 10 to 89%.

Introdução

Investigações realizadas nos últimos três anos, para verificar viroses do gado, distintas das já conhecidas e amplamente estudadas, resultaram no isolamento de 22 amostras de enterovírus bovino; três aparentemente similares, mas ainda insuficientemente caracterizadas e, finalmente, outro agente, tratado anteriormente, cujo comportamento se assemelhava ao do vírus HADEN — parvovírus bovino, tendo sido comprovada estreita relação sorológica entre este e a estirpe isolada na Bahia.

Os parvovírus foram isolados do homem[26] e várias espécies animais[7,8,10,12,14]. O grupo compreende, ainda, os adenosatélites, vírus associados a adenovírus do homem[17], macaco[4] e cão[25], e os contaminantes de certas linhagens celulares contínuas[11].

O primeiro parvovírus bovino foi estudado por Abinanti & Warfield[1], que o designaram HADEN ("hemadsorbing, enteric virus"). Em bezerros infectados experimentalmente[21], o vírus causou manifestações clínicas benignas.

Storz & Warren[22] propuseram a inclusão do vírus HADEN no grupo parvovírus, sob a designação de

* Trabalho realizado no Instituto Biológico da Bahia, 40000 Salvador BA, Brasil.

** Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, 40000 Salvador BA e Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

parvovírus bovino 1 (BPV) porquanto, além das características estabelecidas anteriormente[1], o vírus era inibido por 5-bromo, 5-fluoro-2'-deoxiuridina e actinomicina D. Storz & col.[24] compararam o parvovírus bovino a outros do grupo parvo, não encontrando relações antigênicas entre as estirpes examinadas. Anticorpos foram encontrados em várias espécies animais, como: cabras, cães, cavalos, cobaios, macacos cinomolgo e no soro de feto bovino destinado a cultura de tecidos. O parvovírus bovino foi assinalado na Algéria, por Vincent[27] que isolou e identificou quatro amostras originárias das fezes de bovinos. Bates & col.[6] compararam outras dez cepas, isoladas de bezerros com distúrbios entéricos, que se mostraram homogêneas nos seus aspectos fundamentais, inclusive quanto à antigenicidade. Entre elas, duas foram obtidas de infecção mista com enterovírus, mediante cultivo com soro imune anti-êntero.

O presente relato contém os resultados das investigações sobre o vírus já tratado[2], inclusive sua distribuição, fundamentada na presença de anticorpos inibidores de hemaglutinação.

Material e Métodos

Coleta e preparação do material para exame — Amostras de fezes, coletadas diretamente na ampola retal, foram emulsionadas em solução salina balanceada de Hank's, na proporção de 20%, e a suspensão centrifugada a 1500 r.p.m., por 10 minutos. O sobrenadante foi submetido a dois ciclos, em centrífuga refrigerada, ambos a 2500 r.p.m., por 30 minutos, a 5°C e, ao sobrenadante da última operação, foram adicionadas 1000U de penicilina e 0,001g de estreptomicina p/mℓ. Após meia hora de incubação em geladeira, foi acrescentado igual volume de Hank's, sem antibióticos. O material não usado, imediatamente, permaneceu estocado em congelador, a -20°C, até o momento de sua utilização.

Cultura de tecido — Culturas primárias, de células renais de feto bovino (RFB), foram preparadas por extração pela tripsina a 0,25%, em solução salina tamponada e cultivadas em solução de Hank's, com 0,5% de hidrolisado de lactalbumina, 0,1% de extrato de levedo, 10% de soro de vitelo e 300U de penicilina e 0,30mg de estreptomicina p/mℓ (H's LL). Ao terceiro dia de incubação em estufa, a 36-37°C, o meio foi substituído por outro de mesma composição.

O meio de manutenção era composto de solução salina balanceada de Earle, com 0,5% de hidrolisado de lactalbumina (EL). Além de RFB, foram utilizados outros sistemas celulares, como o LLC-MK 2 (rim de macaco reso), BHK-21 (rim de criceto), IB-RS-2 (rim de suíno) e TB-IBB (célula testicular de origem bovina). A linhagem celular IB-IBB, de intestino bovino, que anteriormente havia se mostrado suscetível, foi interrompida.

Animais e experimentação — Cobaias gestantes, coelhos, frangos e camundongos, adultos e neonatos, foram inoculados pelas vias IP, IC e IV. Embriões de galinha foram inoculados na cavidade alantóide.

Resistência ao éter e filtração — Para o exame da resistência ao éter[3], deixou-se que o éter etílico atuasse sobre o vírus por 18 horas em geladeira, transferindo-se o material para estufa a 36-37°C, durante 30 minutos, para que houvesse a evaporação. Em seguida, procedeu-se a titulação comparativa entre o material tratado e o não tratado. O vírus foi filtrado em vela Berkefeld W, previamente comprovada, titulando-se o material filtrado e o não filtrado.

Titulações — Os títulos do vírus foram determinados pelo método convencional: 0,10mℓ de cada diluição decimal era inoculado em quatro tubos de culturas jovens, e o volume completado para 1,0mℓ. Após 7-9 dias a 36-37°C, removia-se o meio e os tubos eram lavados duas ou três vezes com solução de Hank's. Em seguida, adicionava-se 1,0mℓ de Hank's, contendo 0,10% de hemácias de cobaio. Os tubos tratados ficavam repousando inclinados, à temperatura ambiente, durante 30-40 minutos, sendo então examinados ao microscópio para observação da hemadsorção. Os títulos foram calculados pelo método de Reed & Muench[18].

Preparação de soro imune — Três coelhos receberam, por via venosa, quatro inoculações de 3,0mℓ do vírus na sétima passagem, em intervalos de quatro dias. Dez dias após a última inoculação, coletou-se, por punção cardíaca, o sangue. Aguardou-se a coagulação em temperatura ambiente e o soro foi separado por centrifugação. Este foi inativado por meia hora a 56°C e inoculado em caldo tioglicolato. O sangue retirado de cada animal, três dias antes do processo de imunização, foi tratado como acima e examinado para evidenciação de anticorpos.

Processamento dos soros — Todos os soros empregados foram processados pelo método Clark & Casals[9]. O soro tratado pelo caolim foi adsorvido com hemácias de cobaio, pela adição de 0,25mℓ do sedimento de eritrócitos, previamente lavados, para cada 5,0mℓ de soro tratado. As hemácias foram separadas por centrifugação a 1500 r.p.m. durante 10 minutos, a 5°C, sendo o sobrenadante decantado e submetido a exame para evidenciação de aglutininas. Quando necessário, foi feita nova extração. As amostras processadas permaneceram estocadas em congelador, a -20°C, até o momento do exame.

Hemadsorção (HAD) — Para este caso, foi empregada a técnica de Shelokow & col.[20], experimentando-se eritrócitos de várias espécies: humano, tipo "O", cobaio, coelho, carneiro, cavalo, boi e galinha. Os tubos infectados, aos quais era juntada a suspensão de hemácias, permaneceram inclinados à temperatura ambiente ou na geladeira, a 5°C, por 30 minutos ou até uma hora, procedendo-se, então, a leitura sob o microscópio.

Hemaglutinação (HA) e inibição de hemaglutinação (HI) — Estas provas foram executadas conforme o método de Salk[19]. Na primeira (HA), procedeu-se a ensaios com glóbulos das espécies referidas para HAD. Comprovada a seletividade do vírus para hemácias humanas e de cobaio, estes substratos passaram a ser empregados preferencialmente. Para determinação dos títulos hemaglutinantes, foram feitas diluições duplicadas do vírus em 0,50mℓ de solução fisiológica, acrescentada de igual volume de eritrócitos a 0,5%. Após duas horas de incubação à temperatura ambiente, foi feita a primeira leitura do teste. Entre 6-10 horas após a incubação em geladeira, foi feita a segunda leitura. Por vezes, deixou-se o teste incubando em geladeira, durante toda a noite.

Para os testes de HI, foram empregadas oito unidades hemaglutinantes. As misturas soro-vírus ficaram à temperatura ambiente, por uma hora, após o que eram adicionadas de suspensão de hemácias de cobaio a 0,5%. Os testes permaneceram à temperatura ambiente por duas horas, quando eram feitas as leituras preliminar e definitiva, 6-10 horas após incubação em geladeira.

Neutralização — Diluições decimais do vírus foram preparadas em EL, iniciando-se a 1:5. Em seguida, transferia-se 0,50mℓ de cada diluição para tubos de hemólise e a cada tubo da série era adicionado igual volume de soro imune, diluído a 1:10, no mesmo diluente. Em outra série de tubos de hemólise, misturou-se, às diluições do vírus, igual volume de soro obtido de coelhos não imunizados. As misturas soro-vírus foram incubadas a 37°C, por uma hora e, então, inoculadas em culturas de RFB. Para cada diluição, foram empregados quatro tubos de cultivo e a dose foi de 0,20mℓ por tubo. Terminada a operação, completava-se o volume para 1,0mℓ, com novo meio nutritivo, e as culturas retornavam a 36-37°C. Após sete dias de incubação, os tubos foram tratados como referido para *Titulações* e as culturas examinadas sob o microscópio depois de uma hora à temperatura ambiente. Os títulos infectantes foram calculados pelo método convencional, já mencionado, considerando-se as diferenças dos títulos verificados entre os dois soros como índice de neutralização.

Relações sorológicas — (a) *Neutralização* — Estas provas foram realizadas em dois sentidos: soro de coelhos imunizados com a amostra Bahia (ORG 603), misturado ao vírus homólogo e ao parvovírus bovino (cepa HADEN); e soro imune de coelhos, contra o parvovírus bovino, que se fez reagir contra o vírus homólogo e com a amostra Bahia. Em ambos os casos serviu como controle o soro dos coelhos obtido antes da imunização. (b) *Inibição da hemaglutinação (HI)* — Nos testes de HI, foram utilizados os mesmos soros referidos acima e três amostras adicionais, obtidas de bovinos do campo, sendo duas (nrs. 452 e 465) sabidamente positivas e outra (nr. 472) negativa. Os testes também foram executados em dois sentidos, empregando-se oito unidades hemaglutinantes, sendo a suspensão de hemácias acrescentada à mistura após uma hora de incubação à temperatura ambiente. As leituras finais foram feitas após uma noite de incubação em geladeira.

Inquérito sorológico — A pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação incluiu 621 amostras de soro de bovinos, 67 de origem humana e 12 de frangos. Das amostras de soros bovinos, 508 foram do Estado da Bahia, 10 do Estado da Guanabara, 35 do Estado do Rio de Janeiro e 68 do Estado de São Paulo. Os animais da Bahia pertenciam a 24 rebanhos, localizados em 17 municípios; os da Guanabara, a um rebanho, de um município; os do Estado do Rio de Janeiro a outro rebanho, também de um município; e, finalmente, os de São Paulo faziam parte de dois rebanhos, de duas localidades distintas.

Resultados

Isolamento do vírus — As reações nas culturas inoculadas com o material fecal foram pouco características. Entre o 10º e 12º dia, apareceram células redondas e ovais, que progrediram discretamente. Entretanto, na passagem seguinte, células com o mesmo aspecto já eram evidentes entre o 4º e o 6º dia. Com o prolongamento da incubação, o processo estendeu-se paulatinamente sobre o estrato celular e o efeito citopático (ECP) completou-se 8-9 dias após a inoculação. Retirado o meio desses tubos de cultura, fez-se prova de hemadsorção com hemácias de cobaio, com resultados fortemente positivos. À medida em que se sucederam as passagens, o ECP tornou-se mais precoce e extenso: aparece, entre 36-48 horas, e se completa 4-6 dias após a inoculação. Da emulsão fecal original, fez-se nova inoculação, em tubos de outra partida de cultura de RFB, cujos resultados foram praticamente idênticos, inclusive quanto à hemadsorção. Determinações da infecciosidade do vírus, realizadas em diferentes passagens, flutuaram em torno de 10^5.

Os animais inoculados não revelaram manifestações

clínicas aparentes, nem foi possível evidenciar a proliferação do vírus em ovos embrionados.

Hemaglutinação e hemadsorção — A atividade hemaglutinante e hemadsorvente ocorreu apenas com eritrócitos humanos e de cobaio. Ambas as reações foram estáveis e a hemadsorção característica; os glóbulos se aderiram fortemente sobre a cultura, formando figuras irregulares, de dimensões variáveis, às vezes mais pronunciadas em certas áreas. Contudo, o processo foi lento, comparativamente ao vírus da parainfluenza, por exemplo. Os títulos hemaglutinantes, nas primeiras passagens, oscilaram entre 1:160-1:320. Entretanto, após o estabelecimento do vírus ao sistema de cultivo, ocorreram títulos 1:1280-1:5120, ou mais altos.

Efeito do éter etílico e da filtração — A filtração em Berkefeld W e o tratamento pelo éter não afetaram a infecciosidade do vírus. As titulações comparativas, entre o filtrado e o não filtrado, revelaram diferenças nos títulos de 1,50 $\log_{10}$. No caso do éter, o tratado titulou 0,50 $\log_{10}$ acima do não tratado.

Relações sorológicas — Pelo exame da Tabela 1, verifica-se que o soro antiparvo bovino neutralizou e inibiu o vírus homólogo e a nova estirpe. Por outro lado, o soro de coelhos, imunizados com a amostra em estudo, neutralizou e inibiu o vírus homólogo e a cepa protótipo HADEN. Finalmente, os soros dos bovinos de campo inibiram ambos os vírus, em títulos equivalentes.

Tabela 1

Comparação sorológica entre o parvovírus bovino (HADEN) e o Org-603 (Bahia)

Vírus	Tipo do soro	Índice neutralizante	Inibição da hemaglutinação
Parvo (HADEN)	Normal	0	< 20
	Imune		
	Parvo	4.50	1280
	Org-603	4.33	640
	Bovino**		
	472		< 20
	452		320
	465		160
Org 603	Preimune	0	< 20
	Imune		
	Org-603	4.50	640
	Parvo	4.50	640
	Bovino**		
	472		< 20
	452		± 320
	465		160

* Recíproca da diluição mais alta do soro que inibiu o vírus
** Animal de campo. Infecção natural

Inquérito sorológico — Animais portadores de anticorpos foram encontrados em todos os rebanhos examinados, com variação de 10 a 89%. No cômputo total, 66,5% dos soros continham anticorpos (Tabelas 2 e 3), cabendo a maior percentagem a animais de São Paulo (84%), seguindo-se os dos Estados do Rio de Janeiro (83%), Bahia (64%) e, por fim, Guanabara (30%). Das 67 amostras de soro humano, seis inibiram o vírus, na diluição a 1:20. Das 12 aves, três titularam 1:20, e nove 1:40.

Tabela 2

Anticorpos (HI) para o parvovírus bovino Org-603 (Bahia)

Títulos (HI)	Nº de soros	Porcentagem do total
≤ 1:10*	208	33
1:20	80	13
1:40	115	19
1:80	111	18
≥ 1:160	107	17

Total de soros examinados: 621
Total de positivos: ≥ 1:20, 413
Porcentagem de positivos: 66,5

* Recíproca da diluição mais alta do soro que inibiu o vírus

Discussão

O estudo restringiu-se a uma única amostra de vírus, isolada de fezes de um bezerro, com aproximadamente quatro meses de idade. O método empregado na preparação dos espécimes e o uso exclusivo do RFB, não tão sensível ao vírus como as culturas de pulmão de feto bovino (PFB)[6], concorreram, provavelmente, para que outras amostras não fossem reveladas. O estágio de desenvolvimento das culturas constitui outro fator influente. Certos parvovírus exibem afinidade especial para células em processo ativo de divisão, sendo possível que, ao examinar outros espécimes, esta particularidade não tivesse sido observada. Embora se pudesse vislumbrar alguma reação nas culturas inoculadas com material fecal, o ECP só se manifestou mais clara e plenamente após uma ou duas passagens. Nestas condições, como o objetivo, em princípio, não era estudar o parvovírus, é compreensível que outras amostras do agente tivessem escapado à percepção.

Nas experiências de Kilham & Margolis[15], ficou comprovado que o RV atravessa a barreira placentária e desencadeia estados patológicos, por vezes graves, nos fetos de ratas infectadas. O parvovírus de suínos (PPV) foi assinalado em culturas "normais" de rim de suíno[16], tendo sido verificado que os linfócitos circulantes, gânglios linfáticos mesentéricos, rins e

Tabela 3

Anticorpos (HI) para o parvovírus bovino em animais de diferentes origens

Estado de origem	Nº rebanhos HI positivos/nº examinados	Nº bovinos HI positivos/nº examinados	Porcentagem soros HI positivos	Distribuição por títulos dos soros HI positivos			
				1:20	1:40	1:80	1:160
Bahia	24/24	324/508	64	61	85	89	89
Guanabara	1/1	3/10	30	1	2	0	0
Rio de Janeiro	1/1	29/35	83	11	9	7	2
São Paulo	2/2	57/68	84	7	19	15	16

testículos de bezerros neonatos, aos quais foi ministrado o vírus, estavam infectados[23]. Johnson & Collings[13] inocularam o PPV em porcas gestantes, verificando a passagem do vírus através da placenta. Os rins dos leitões nascidos eram infectados, sendo que os melhores resultados para evidenciação do vírus foram obtidos com a cultura do próprio órgão. O soro dos leitões continha anticorpos, antes que os animais tivessem acesso ao colostro. Portanto, não seria estranhável a ocorrência do parvovírus bovino em culturas de RFB normais. Contudo, o reisolamento do vírus, a partir da preparação original, inoculada em tubos de outra partida de cultivo, torna remota a hipótese da preexistência do vírus nas culturas empregadas por ocasião das primeiras inoculações. A questão foi considerada, tão logo se verificou tratar-se de um agente transmissível, que revelava propriedades específicas.

A ação patogênica do parvovírus para a espécie bovina ainda não ficou plenamente esclarecida. Parece, contudo, que o tubo intestinal constitui a sede predileta do vírus. No caso em estudo, o animal do qual se isolou o agente integrava um rebanho pouco numeroso, que havia sofrido um surto diarréico rebelde aos tratamentos usuais — antibióticos, sulfas, etc. Aproximadamente 30 dias após o episódio, alguns bezerros ainda eliminavam fezes pastosas e, de um deles, se isolou o vírus. Quarenta dias depois, procedeu-se à coleta de sangue dos animais entre seis meses e um ano de idade, constatando-se que 75% tinham anticorpos (HI) com títulos de 1:20-1:80, sendo que o soro do portador do vírus atingiu 1:80.

A alta distribuição de anticorpos indica que a infecção pelo parvovírus bovino deve ser freqüente no gado vacum do Brasil, pelo menos nas áreas examinadas. Nas amostras dos Estados de São Paulo e do Rio de Janeiro, mesmo considerando o pequeno número (68 e 35, respectivamente), o percentual de animais HI positivos se equivale ao observado no Estado de Maryland, EUA (86 e 83%)[1,21]. Nas amostras da Bahia, compreendendo soros de 508 animais, o índice foi mais baixo do que os anteriores, aproximando-se às do Estado do Colorado, EUA[24] (65%) e aquém do encontrado na Algéria[27] (70%). Quanto à incidência entre os plantéis, no Brasil, atingiu a 100%, isto é, em todos os 28 rebanhos estudados, existiam animais com anticorpos, com índice superior ao do Colorado[24] (83%). A maior parte dos soros da Bahia destinava-se a outras observações; os demais, bem como os dos Estados da Guanabara, Rio de Janeiro e São Paulo, foram coletados especialmente para estes estudos. As idades dos animais da Bahia variaram entre 30 dias e acima de dois anos e, os demais, de quatro meses a ano e meio. Em geral, os bovinos com 30-60 dias reagem mal; acusam títulos baixos ou não reagem em proporções maiores às das encontradas nos mais velhos.

As reações observadas com os soros de origem humana e os de aves merecem estudos mais aprofundados. Os títulos baixos dos primeiros (1:20) e sua uniformidade nos das aves podem ser devidos à influência de fatores inespecíficos.

As provas sorológicas evidenciaram que as amostras do parvovírus bovino, representadas pela cepa HADEN, protótipo, e a isolada são idênticas ou estreitamente relacionadas. Parece existir homogeneidade antigênica entre todas as estirpes conhecidas, para os EUA[1,6], Algéria[27] e Brasil, agora caracterizada.

Agradecimentos

Agradecemos a gentileza da remessa do vírus HADEN e respectivo soro imune, aos Drs. Francis R. Abinanti, da Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, California, e J. Storz, da Colorado University, Fort Collins, Colorado, EUA. Pelo obséquio em enviar amostras de soro bovino, aos Drs. Adolfo M. Penha e Waldyr Giorgi, do Instituto Biológico, São Paulo, e Renato Augusto da Silva, do IPEACS, Rio de Janeiro. Pela valiosa colaboração nas pesquisas bibliográficas, à Sra. Rosina B. A. Carvalho dos Santos, da Biblioteca Central, Universidade Federal da Bahia.

Referências Bibliográficas

1. ABINANTI, F. R. & WARFIELD, M. S. — Recovery of a hemadsorbing virus (HADEN) from the gastrointestinal tract of calves. *Virology*, 14:288-289, 1959.
2. ALICE, F. J. — Um vírus hemadsorvente e citopático isolado de material fecal de bovino. (Nota Prévia). *Rev. bras. Biol.*, 32:513-514, 1972.
3. ANDREWES, C. & HORSTMANN, D. M. — The susceptibility of viruses to ethyl ether. *J. gen. Microbiol.*, 3:290-297, 1940.
4. ATCHISON, R. W.; CASTO, B. C. & HAMMON, W. McD. — Adenovirus — associated defective virus particles. *Science*, 149:754-755, 1965.
5. BATES, R. C.; STORZ, J. & WARREN, G. S. — Host cell range and conditions for isolation of bovine parvoviruses. *Bact. Proc.*, 71:224, 1971.
6. BATES, R. C.; STORZ, J. & REED, D. E. — Isolation and comparison of bovine parvoviruses. *J. infect. Dis.*, 126:531-536, 1972.
7. BINN, L. N.; LAZAR, E. C.; EDDY, G. A. & HAJIMA, M. — Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Inf. Immun.*, 1:503-508, 1970.
8. CARTWRIGHT, S. F.; LUCAS, M. & HUCK, R. A. — A small haemagglutinating porcine DNA virus. *J. comp. Path.*, 79:371-377, 1969.
9. CLARKE, D. H. & CASALS, J. — Technique for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropodborne viruses. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 7:561-573, 1958.
10. CRAWFORD, L. W. — A minute virus of mice. *Virology*, 29:605-612, 1966.
11. HALLAUER, C.I.; SIEGL, G.C. & KRONAUER, G. — Parvoviruses as contaminants of permanent human cell lines. III. Biological properties of the isolated viruses. *Arch. ges. Virusforsch.*, 38:366-382, 1972.
12. JOHNSON, R. H. — Feline panleucopaenia. I. Identification of a virus associates with the syndrome. *Res. vet. Sci.*, 6:466-471, 1965.
13. JOHNSON, R. H. & COLLINS, D. F. — Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. *Res. vet. Sci.*, 12:570-572, 1971.
14. KILHAM, L. & OLIVIER, L. J. — A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology*, 7:428-437, 1959.
15. KILHAM, L. & MARGOLIS, G. — Spontaneous hepatitis and cerebellar "hypoplasia" in suckling rats due to congenital infections with rat virus. *Amer. J. Path.*, 49:457-475, 1960.
16. MAYR, A.; BACHMANN, P. A.; SIEGL, G.; MAHNEL, H. & SHEFFY, B. E. — Characterization of a small porcine DNA virus. *Arch. ges. Virusforsch.*, 25:38-51, 1968.
17. MELNICK, J. L.; MAYOR, H. D.; SMITH, K. O. & RAPP, F. — Association of 20-millimicron particles with adenoviruses. *J. Bact.*, 90:271-274, 1965.
18. REED, L. J. & MUENCH, J. A. — A simple method estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27:493-497, 1938.
19. SALK, J. E. — A simplified procedure for titrating agglutination capacity of influenza virus and the corresponding antibody. *J. Immunol.*, 49:87-98, 1944.
20. SHELOKOW, A.; VOGEL, J. E. & CHI, L. — Hemadsorption (adsorption-hemagglutination) test for viral agents in tissue culture with special reference to influenza. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 97:802-809, 1958.
21. SPAHN, C. J.; MOHANTY, S. B. & F. M. — Experimental infection of calves with hemadsorbing enteric (HADEN) virus. *Cornell Vet.*, 56:377-386, 1966.
22. STORZ, J. & WARREN, G. S. — Effect of antimetabolites and actinomycin D on the replication of HADEN, a bovine parvovirus. *Arch. ges. Virusforsch.*, 30:271-274, 1970.
23. STORZ, J. & BATES, R. C. — Sites of replication of bovine parvovirus 1 in orally inoculated calves. *Bact. Proc.*, 71:224, 1971.
24. STORZ, J.; BATES, R. C.; WARREN, C. S. & HOWARD, T. H. — Distribution of antibodies against bovine parvovirus 1 in cattle and other animal species. *Amer. J. vet. Res.*, 33:269-272, 1972.
25. SUGIMURA, T. & YANAGAWA, R. — Effect of sodium desoxycholate on infectious canine hepatitis virus, and an addicional description of a small associated virus. *Jap. J. vet. Res.*, 17:32-41, 1969.
26. TOOLAN, H. W. — Experimental production of mongoloid hamster. *Science*, 131:1446-1448, 1960.
27. VINCENT, J. — Isolement en Algérie de quatre souches de *Parvovirus bovis*. *Ann. Inst. Pasteur*, 121:811-814, 1971.

Isolamento de *Corynebacterium haemolyticum* de vaginite humana

R.M. Yanaguita*, C.A. Santa Rosa*, & M.C. Martin**

Resumo

Corynebacterium haemolyticum foi isolado de vaginite humana e identificado de acordo com a técnica recomendada por MacLean & col. e por Hermann. Os testes bioquímicos e a sensibilidade a antibióticos são apresentados.

Summary

Isolation of Corynebacterium haemolyticum from human vaginitis

Corynebacterium haemolyticum was isolated from a human case of vaginitis and identified according to the techniques recommended by MacLean & col. and by Hermann. Biochemical tests and drug sensivity by the isolate are reported.

Desde o trabalho pioneiro de MacLean & col. (*J. infect. Dis.*, 79:69-90, 1946), que isolaram *Corynebacterium haemolyticum* de infecções de pele, nasofaringe e otites, de militares e nativos das Ilhas Marianas, no sul do Pacífico, raras publicações surgiram relacionadas com esse pequeno bacilo gram-positivo. A espécie se assemelha muito a *Corynebacterium pyogenes* e *Corynebacterium ovis*, ambas responsáveis por infecções em animais.

Este trabalho relata o isolamento e identificação de um bacilo gram-positivo semelhante ao descrito por MacLean & col..

Secreção vaginal, obtida de um caso de vaginite de paciente adulta, foi colhida em laboratório e emulsionada em solução fisiológica, estéril, para exame.

Após o exame bacterioscópico, foi feita a inoculação em ágar-sangue de carneiro a 10%, ágar-suco de tomate, ágar-chocolate, meio de Thayer-Martin, EMB (Levine) e meio de ágar-Sabouraud, visando-se o isolamento de *Staphylococcus* e *Streptococcus, Lactobacillus, Haemophilus, Neisseria gonorrhoeae,* Enterobacteriaceae e *Candida.* Todos os meios foram incubados a 37°C, durante 48 horas, sendo que o meio de Thayer-Martin foi incubado em atmosfera de CO_2.

As colônias desenvolvidas em ágar-sangue foram analisadas morfologicamente, preparando-se esfregaços pelo método de Gram e um outro pelo método de Albert-Laybourn.

Em seguida, foram feitas inoculações em caldo TSB - "Triptic Soy Broth", enriquecido com soro estéril de coelho. Para os testes de fermentação de carboidratos, foi utilizado o caldo peptonado "Andrade Peptone Water" (Oxoid). As soluções de carboidratos a 10%, foram filtradas em Seitz e adicionadas ao meio base, dando a concentração final de 1%. Todos os meios foram enriquecidos com soro estéril de coelho, conforme a recomendação de Hermann (*Amer. J. med. Tech.*, 27:61-66, 1961).

Outros testes consistiram na verificação da produção de catalase, indol, liquefação de gelatina, produção de H_2S, ação sobre o leite e motilidade, observadas as recomendações do "Manual of Microbiological Methods" (Society of American Bacteriologists, New York, McGraw-Hill Book Co., Inc., 1957). Os meios usados para os testes foram incubados a 37°C, durante 14 dias, com leitura a cada 24 horas.

A atividade hemolítica foi investigada em ágar-nutriente, adicionado de sangue de carneiro, desfibrinado, na concentração final de 10%. Procedeu-se, ainda, ao teste de sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos, com discos Difco, de acordo com o esquema de Kirby-Bauer (*Am. J. clin. Path.*, 45:493-496, 1966), utilizando-se os seguintes antibióticos

* Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, SP, Brasil.
** Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

em suas respecitvas concentrações: ampicilina, 10 μgm; ácido nalidíxico, 30 μgm; bactrim (Roche), 25 μg; cefaloridina, 30 μgm; cloranfenicol, 30 μgm; cloxacilina, 1 μgm; eritromicina, 15 μgm; estreptomicina, 10 μgm; gentamicina, 10 μgm; lincomicina, 2 μgm; neomicina, 30 μgm; nitrofurantoína, 300 μgm; novobiocina, 30 μgm; penicilina G, 10 U; polimixina B, 300 U e tetraciclina, 30 μgm.

O resultado do exame bacterioscópico revelou a presença de bacilos gram-positivos, com morfologia semelhante àqueles apresentados por membros do gênero *Corynebacterium.* A cultura foi positiva em ágar-sangue, com colônias que apresentavam cerca de 0,5 mm de diâmetro, após 24 horas de incubação, circundadas por uma zona de hemólise, de 1 mm. Após 48 horas de incubação, as colônias apresentavam cerca de 1 mm de diâmetro, com aumento das zonas de hemólise para 3 a 5 mm de diâmetro. Os esfregaços, corados pelo método de Gram, revelaram bacilos gram-positivos; pelo método de Albert-Laybourn, não demonstraram a presença de granulações metacromáticas. Em caldo TSB, o crescimento foi do tipo granular, sendo que a adição de soro estéril de coelho estimulou enormemente o crescimento, turvando o caldo, uniformemente. Os resultados das provas bioquímicas e do teste de sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos estão na Tabela 1.

Comparando os resultados culturais e testes bioquímicos com os dados apresentados por MacLean & col. (*J. infect. Dis.,* 79:69-90, 1946) e por Hermann (*Amer. J. med. Tech.,* 27:61-66, 1961), o microrganismo isolado apresentou características idênticas às descritas pelos mencionados pesquisadores para *Corynebacterium haemolyticum.*

A bactéria poderia ser confundida com as do gênero *Lactobacillus,* não fosse sua incapacidade de crescer em ágar-suco de tomate. A morfologia das colônias, em ágar-sangue, foi idêntica à de *Streptococcus.* No entanto, o exame bacterioscópico mostrou tratar-se de bacilos gram-positivos. Pelos testes bioquímicos, concluiu-se tratar-se de *Corynebacterium haemolyticum.* Neste gênero, a bactéria isolada poderia ser confundida com *Corynebacterium pyogenes.* Entretanto, este, segundo o manual de Bergey, fermenta a xilose e liquefaz a gelatina, enquanto o germe isolado se portou de maneira contrária. Aliás, a semelhança entre as duas espécies de *Corynebacterium* já foi discutida por Barksdale & col. (*J. gen. Microbiol.,* 16:749-758, 1957) que consideraram *Corynebacterium haemolyticum* como mutante de *Corynebacterium pyogenes,* pelo resultado das análises da composição de parede celular. Quanto à fermentação irregular da lactose, o fato já foi relatado por Hermann & Weaver (Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, pp. 88-94, 1970). Quanto à sensibilidade a antibióticos, nove amostras foram estudadas por Hermann (*Amer. J. med. Tech.,* 27:61-66, 1961) e estas foram sensíveis à penicilina, eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina e estreptomicina. A bactéria isolada, entretanto, mostrou-se resistente à penicilina G e à estreptomicina, diferindo, assim, das amostras de Hermann. Deste fato, no entanto, não podemos tirar conclusões, já que a nossa análise foi feita em apenas uma amostra.

A ocorrência de *Corynebacterium haemolyticum* de vaginite é um fato inédito, como o é também a ocorrência desta bactéria em nosso meio.

Tabela 1

Testes bioquímicos e antibiograma com a bactéria isolada

Bioquimismo		Antibiograma	
Amido	–	Ampicilina	R
Arabinose	–	Ácido nalidíxico	R
Catalase	–	Bactrim	R
Celobiose	A	Cefaloridina	R
Gelatina	–	Cloranfenicol	S
Glicose	A	Cloxaciclina	R
H_2S	–	Eritromicina	S
Indol	–	Estreptomicina	R
Lactose	At	Gentamicina	R
Leite	Ct	Lincomicina	S
Maltose	A	Kanamicina	R
Manitol	–	Neomicina	R
Melezitose	–	Nitrofurantoína	R
Melibiose	A	Novobiocina	S
Motilidade	–	Penicilina G	R
Nitrato	–	Polimixina B	R
Rafinose	A	Tetraciclina	S
Sacarose	A		
Salicina	A		
Sorbitol	–		
Trehalose	A		
Urease	–		
Xilose	–		

– Negativo; A Acidificação; At Acidificação tardia; Ct Coagulação tardia; S Sensível; R Resistente.

Staphylococcus em farinha de mandioca vendida a granel

Manoel Tachard Barbosa*

Resumo

De 167 amostras de *Staphylococcus* isoladas de farinha de mandioca vendida a granel nas feiras livres e mercados da cidade de Salvador, BA, Brasil, cerca de 97% foram coagulase-negativas e 3% coagulase-positivas. Outros testes para caracterização das amostras foram realizados.

Summary

Staphylococcus from manihot flour sold unpacked

Among 167 samples of *Staphylococcus* isolated from manihot flour sold unpacked at the street market in Salvador city, Bahia State, Brazil, about 97% were coagulase-negative and 3% coagulase-positive. Other tests were made to characterize the samples isolated.

O isolamento e caracterização de estafilococos em diversos tipos de alimentos é relatado com frequência. Entretanto, não há referência ao isolamento na farinha de mandioca, consumida abundantemente na alimentação das populações no nordeste brasileiro. Sua distribuição ao consumidor é anti-higiênica, sem a proteção de embalagens adequadas, podendo entrar em contato direto com vetores de contaminação.

Para verificar a ocorrência de *Staphylococcus* na farinha de mandioca, vendida nas feiras livres e mercados da cidade de Salvador, BA, Brasil, as amostras foram coletadas com as próprias conchas metálicas utilizadas pelos vendeiros, e acondicionadas em sacos plásticos para transporte até o laboratório. Cerca de 10,0g de cada amostra foram semeadas em 90,0mℓ de caldo infuso de cérebro e coração "Brain Heart Infusion Broth" (DIFCO), contendo 10,0% de cloreto de sódio. Após incubação dos frascos a 37°C, durante 48h, as culturas foram semeadas, por esgotamento, na superfície de "Chapman Stone Agar" (BBL), incubando-se as placas a 37°C, durante 48h. Colônias com características de *Staphylococcus* foram reisoladas no mesmo meio, para obtenção de culturas puras. Os isolamentos obtidos foram transferidos para caldo infuso. Posteriormente, foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram. As culturas contendo cocos gram-positivos, pequenos, esféricos ou ovalados, isolados ou aos pares, em pequenas cadeias ou grupamentos semelhantes a cachos de uvas, foram semeadas, em picada, em agar-triptona-glicose-extrato de levedura, para estoque, de acordo com Weiss, F.A. (Manual of microbiological methods for the Society of American Bacteriologists, New York, McGraw-Hill Co., 1957).

As amostras foram, posteriormente, submetidas às seguintes provas:

Cromogênese: verificada em agar simples, inclinado, deixando-se o tubo à temperatura ambiente, após incubação a 37°C, durante 24h. Pela leitura, as amostras foram separadas em dois grupos: as de pigmentação amarela e as brancas, sem pigmentação.

Fermentação de manitol: de acordo com Mossel (*J. Bacteriol.*, 84:1140-1147, 1962).

Liquefação da gelatina: com o meio thiogel (BBL), a 37°C, durante uma semana.

Prova de DNase: com o meio "DNase Test Agar" (BBL).

Hemólise: determinada em placas preparadas com "agar base" (DIFCO), adicionado de 5,0% de sangue humano ou de coelho. Após incubação a 37°C, durante 24h, era procedida a leitura.

* Depto. de Microbiologia, Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vale do Canela, Salvador, BA, Brasil.

Coagulase: uma alça do crescimento de 24h, em agar simples, foi introduzida em tubo 13 X 100mm, contendo 0,3mℓ de plasma concentrado de coelho, diluído 1:4 em salina fisiológica, estéril. Os tubos foram incubados a 37°C, e as leituras realizadas com intervalos de 60 min, durante 6h. Os tubos negativos foram mantidos à temperatura ambiente, durante 24h.

Os resultados do isolamento e caracterização de *Staphylococcus*, nas amostras de farinha de mandioca, estão apresentados na Tabela 1.

Estafilococos com pigmento amarelo representaram 80,0% das cinco amostras coagulase-positivas e 40,0% das amostras coagulase-negativas. A frequência de isolamento de amostras sem pigmentação amarela representou 20,0% das amostras coagulase-positivas e 60,0% das coagulase-negativas. Atividade hemolítica foi encontrada em 100,0% das amostras coagulase-positivas e em 17,8% das coagulase-negativas.

Apesar do pequeno número das amostras de *Staphylococcus* coagulase-positivas, a predominância das que apresentaram pigmentação amarela concorda com os resultados de Evans, J.B. (*J.Bacteriol.*, 59:545-550, 1948) que, estudando o comportamento de diversos tipos de estafilococos coagulase-positivos, encontrou 89,0% das amostras com pigmentação amarela. Zemelman, R. & Longery, L. (*Appl. Microbiol.* 13:167-170, 1965), estudando amostras de coagulase-positivas, isoladas do leite cru, encontraram 95,8% das amostras com pigmentação amarela.

Apesar de predominante, a pigmentação amarela não foi exclusiva das amostras coagulase-positivas, isoladas da farinha de mandioca, pois amostras coagulase-negativas também exibiram a mesma pigmentação. O isolamento de amostras coagulase-positivas e coagulase-negativas sem a pigmentação amarela enfatiza a informação, muito difundida, sobre a menor importância do pigmento e da hemólise entre as características indicativas de espécie patogênica de *Staphylococcus*. Entretanto, os resultados agora apresentados mostraram atividade hemolítica nas cinco amostras coagulase-positivas isoladas, o que foi também observado por Clark, W.S. & col. (*Appl. Microbiol.*, 9:196-199, 1961), trabalhando com material isolado de leite cru.

Apesar de trabalhar com um número reduzido de amostras, o isolamento de *Staphylococcus* coagulase-positivos de farinha de mandioca que, indistintamente, fermentaram manitol e hidrolisaram gelatina, ressalta a inespecificidade destas provas na caracterização de amostras com potencial patogênico.

O trabalho de Williams, R.E.O. (*Bact. Rev.*, 27:56-71, 1963) mostrou que os estafilococos são parasitas da mucosa nasal e da pele das mãos, ressaltando que 40,0% a 44,0% dos indivíduos sadios são portadores nasais de estafilococos. Dolman, C.E. (*Canad. J. publ. Health*, 34:97-111, 1943) relatou que, estafilococos produtores de enterotoxina são encontrados no vestíbulo nasal e na garganta dos indivíduos, assim como nas feridas e queimaduras das mãos e braços.

De 167 amostras de *Staphylococcus* isoladas da farinha de mandioca, vendida nas feiras livres de Salvador, cerca de 97% foram coagulase-negativas e 3% coagulase-positivas. Como os estafilococos encontrados no meio ambiente são originários de várias fontes (portadores humanos e/ou animais), outras investigações poderão esclarecer a principal fonte de contaminação de produto exposto e vendido em condições anti-higiênicas: os compradores retiram uma porção com a concha, recolhem uma parte com os dedos e a jogam na boca para "provar" se está torrada, desprezando o restante de volta ao saco de farinha.

Tabela 1

Características de 167 amostras de *Staphylococcus* isoladas de farinha de mandioca recolhida nas feiras livres de Salvador

Coagulase	Estirpes	% Positivas					
		Pigmentação		Hemólise	Fermentação do Manitol	Hidrólise da Gelatina	DNase
		Amarela	Branca				
Positiva	5	80,0	20,0	100,0	100,0	80,0	100,0
Negativa	162	40,0	60,0	17,8	73,4	22,5	*

* Prova não executada

Volume 4, Número 1 — Janeiro/Março, 1973

Artigos originais

Dermatofilose proliferativa dos membros em ovinos no Rio Grande do Sul [*Proliferative Dermatophilus infection of the legs in sheeps of Rio Grande do Sul State, Brazil*] — J.O. Lopes, A.T. Londero, M.A.M. Santiago & M.N. Santos 1

Formas L de *Staphylococcus aureus* isoladas no Rio de Janeiro [*L forms of Staphylococcus aureus isolated in Rio de Janeiro*] — L.A. Inglez, M.L.P. Costa & Elisa Penido 5

Revisão

The future of microbiology — J.R. Porter 11

Volume 4, Número 2 — Abril/Junho, 1973

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

Volume 4, Número 3 — Julho/Setembro, 1973

Artigos originais

Aspectos bacteriológicos de paciente com estreitamento uretral crônico [*Bacteriological aspects of patients with chronic urethral stenosis*] — Milton Barros, Moema M.G. Oliveira & Heonir Rocha 39

Human dermatophilosis: the first case in Brazil — A.T. Londero, Cecy D. Ramos & Lenita P. Souza 45

Revisão

Bacterial adherence in infection and immunity — Ronald J. Gibbons 49

Volume 4, Número 4 — Outubro/Dezembro, 1973

Artigos originais

Dosagens microbiológicas de vitaminas em peixes e crustáceos. II-Tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantotênico, riboflavina e piridoxina [*Microbiological assays of vitamins in fishes and crustaceans. II-Thiamine, biotin, nicotinic acid, pantothenic acid, riboflavin and pyridoxin*] — Sílvio Ribeiro & Isaac Roitman 61

Agar eosina-azul de metileno modificado para inibição do crescimento invasor de *Proteus* spp [*A modified eosin-methylene blue agar to inhibit swarming of Proteus spp*] — Elsa F. Rodrigues de Oliveira, João Ramos Costa Andrade, Alexandre Adler Pereira & Italo Suassuna 67

Isolamento e incidência do parvovírus bovino no Brasil [*Isolation and incidence of bovine parvovirus in Brazil*] — Fúlvio José Alice 73

Notas breves

Isolamento de *Corynebacterium haemolyticum* de vaginite humana [*Isolation of Corynebacterium haemolyticum from human vaginitis*] — R.M. Yanaguita, C.A. Santa Rosa & M.C. Martin 79

Staphylococcus em farinha de mandioca vendida a granel [*Staphylococcus from manihot flour sold unpacked*] — Manoel Tachard Barbosa 81