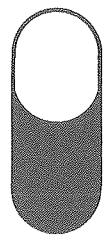


Volume 8 Número 1 Jan.-Mar. 1977

Revista de Microbiologia

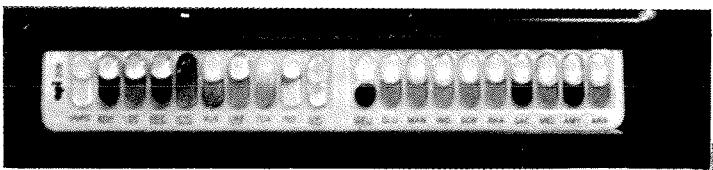
**Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo – Brasil**

REVISTA DE
MICROBIOLOGIA
Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo – Brasil



api system

abriu o caminho da estandardização na identificação bacteriológica.



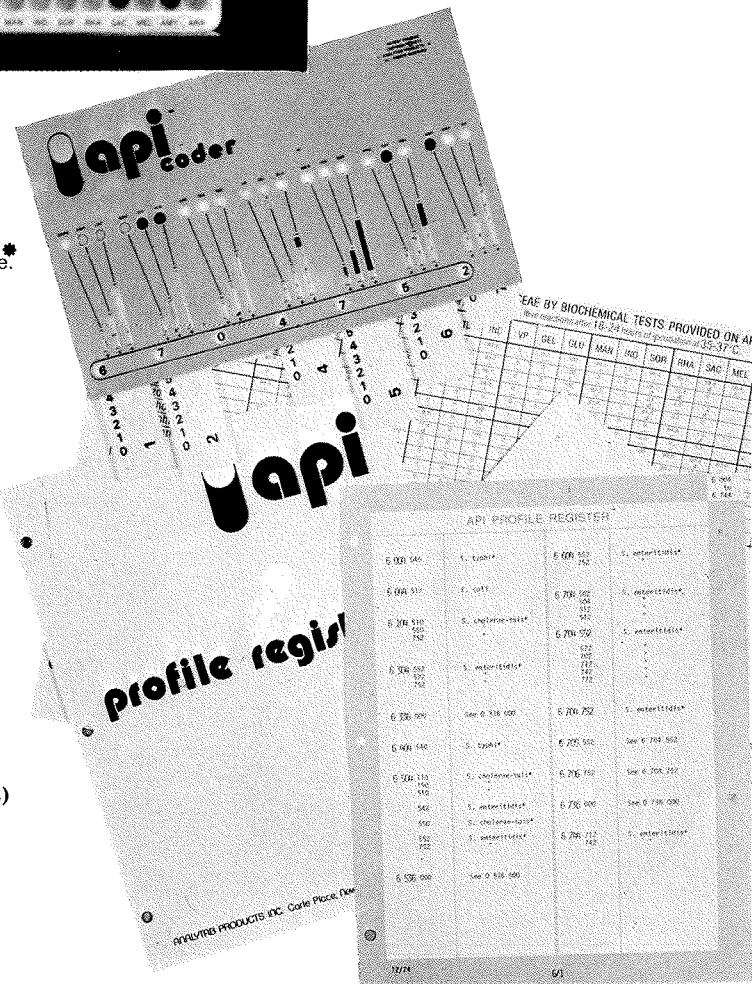
API 20 E e o SISTEMA DE LEITURA CÓDIFICADA põem à disposição dos laboratórios mais de 25.000 cepas registradas de ENTEROBACTERIACEAE e outros GRAM(-) não-Enterobacteriaceae*. Esse é o resultado de vários anos de colaboração entre utilizadores, centros de referência e os serviços de pesquisa API na França e na América. E, amanhã, esse número crescerá ainda mais com a sua participação.

*Pseudomonas, Aeromonas, Vibrio, Moraxela, etc.

Sempre com o mesmo princípio de microtécnica padronizada

API SYSTEM identifica também:

- os germes anaeróbios (API 20 ANAERÓBIOS)
- os agentes das principais micoses encontradas em clínica (API 20 CÂNDIDA)
- germes os mais diversos (API 50 PESQUISA, API 50 LACTOBACILLUS)
- ou apenas as Enterobacteriaceae (API 10 SCREEN)



BIOLAB-MÉRIEUX PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA.

Rua do Resende, 96-A - 2º andar - Tels.: 221-4089 e 242-0050
RIO DE JANEIRO, RJ. - 20.000 - ZC-06

SÃO PAULO - BRASÍLIA - PORTO ALEGRE - RECIFE - BELO HORIZONTE



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 Flávio Alterthum e Sérgio Olavo P. da Costa

Aquisição por não-membros Assinatura anual para quatro números: Cr\$ 200,00 para o Brasil; US\$ 20.00 (via marítima) ou US\$ 25.00 (via aérea) para o Exterior. Números avulsos: Cr\$ 50,00 para o Brasil e US\$ 6.50 (via aérea) ou US\$ 5.00 (via marítima) para o Exterior. Cheques ou ordens de pagamento em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Editor.

Acquisition by non-members Annual subscription for four numbers: US\$ 20.00 (surface mail) or US\$ 25.00 (air mail). Single copies: US\$ 6.50 (air mail) or US\$ 5.00 (surface mail). Checks or money orders for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Editor's office.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria Gobert A. Costa, Presidente. Cláudio A. Jürgensen, Vice Presidente. César Martins de Oliveira, 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. Christovão, Dirce Franco de Araujo, Eduardo O. Cisalpino, Gobert A. Costa, Homero S. Jobim, 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, Seymour 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 Paretha 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 (Nilópolis). SANTA CATARINA: Aquilles A. Cordova Santos (Florianópolis). SÃO PAULO: Deise Pasetto Falcao (Araraquara), Flávio Althertum (São Paulo), Augusto Cesar Montelli (Botucatu) Izabel Yoko Ito (Ribeirão Preto) e Edécio Maluf (Sorocaba). SERGIPE: Raimundo Mendonça de Araujo (Aracaju).

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Sócios Patrocinadores

BIOLAB-MÉRIEUX – Produtos para Laboratórios Ltda.

Coca-Cola Indústrias Ltda. – Rio de Janeiro

Eli Lily do Brasil Ltda.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

Comportamento nuclear no heterobasidiomiceto *Filobasidium floriforme*

João S. Furtado*

Resumo

Coloração, pela técnica de HCl-Giemsa, do fungo heterobasidiomiceto, bipolar, geneticamente dimórfico, *Filobasidium floriforme* Olive (Ustilaginales, Filobasidiaceae). O processo de dicariotização ocorre pela migração de núcleos através de tubos de fusão produzidos a partir de duas células leveduriformes conjugantes ou de várias (até sete), com evidência de migração nuclear preferencial. A célula dicariótica dá origem a hifas bem desenvolvidas que apresentam ansa no septo e crescimento axial predominante. Há tendência de retorno à condição monocariótica, em consequência de divisões nucleares assíncronas, degeneração de um dos dois núcleos do dicárião ou da formação de ramificações uninucleadas. A desdicariotização usualmente conduz à formação das estruturas "haustorioides", descritas por Olive. A pequenez dos núcleos resultantes da cariogamia torna a contagem de cromossomos incerta, mesmo nos estágios paquitenos e diplótenos. A mitose pós-meiotica deixa o basídio com oito núcleos, os quais migram para os oito basidiosporos presos no ápice expandido.

Summary

Nuclear behavior in the heterobasidiomycetes Filobasidium floriforme

HCl-Giemsa staining of the genetically dimorphic, bipolar, heterobasidiomycetes *Filobasidium floriforme* Olive (Ustilaginales, Filobasidiaceae). Dikaryotization occurs through nuclear migration within fusion tubes produced from usually two, but not uncommonly more (up to seven) yeast-like monokaryonts, with evidences of preferential nuclear displacement. Dikaryotic cells give rise to well developed hyphae that exhibit clamp-connections at the septa and a predominant axial growth. A marked tendency to return to the monokaryotic stage is due to asynchronous nuclear division, degeneration of one of the nuclear pair of the dikaryon, or the formation of uninucleate branches. Consequently, the cell loses the hyphal habit and gives origin to the "haustorioid" structure of Olive. The smallness of the fusion nuclei made chromosome counts uncertain even at pachytene-diplotene stages. Post-meiotic mitosis leads to an eight-nucleate basidium that produces eight sessile basidiospore primordia that may be induced at the end of second meiotic division when the basidium has only four nuclei. The occurrence of basidium with four uninucleate and four anucleate basidiospores reveals a deviation in the nuclear pattern during basidiosporogenesis.

Introdução

Filobasidium floriforme Olive é um fungo heterobasidiomiceto que produz basídios tipo-*Tilletia*, proposto para a tipificação de um novo gênero e nova família, Filobasidiaceae, incluída em Ustilaginales, embora não necessariamente como um "carvão"(7).

O fungo foi isolado de inflorescências mortas de *Erianthus giganteus* (Walt.) Muhl. e caracterizado por células monocarióticas leveduriformes blastoporulantes que exibem padrão de sexualidade bipolar heterotálico; estágio dicariótico micelial cujas hifas apresentam ansa ("clamp-connection") no septo; pro-basídio de parede pouco espessada e de diâmetro pouco desenvolvido, asseptado, que produz seis a oito, mais raramente cinco

e comumente sete, basidiosporos sésseis presos a ápice abruptamente expandido. Colônias leveduriformes não formaram hifas após vários meses em cultura, em diversos meios.

O gênero foi adicionado da espécie *Filobasidium capsuligenum* (Fell et al) Miranda, resultante da combinação baseada em *Leucosporidium capsuligenum*, originalmente descrita para acomodar o estágio perfeito de *Torulopsis capsuligena*(6). Recentemente, outro gênero, *Filobasidiella*, tipificado por *F. neoformans* Kwon-Chung, foi proposto para acomodar o estágio perfeito de *Cryptococcus neoformans*(5).

Tendo em vista o crescente interesse sobre os membros de Filobasidiaceae, os dados sobre o comportamento nuclear em *F. floriforme* estão sendo apresentados**.

* Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01000 São Paulo SP.

** Dados obtidos durante o estágio de pós-doutoramento, em 1968, no laboratório do Dr. Lindsay S. Olive, University of North Carolina at Chapel Hill, N.C., EUA.

Material e Métodos

Linhagens *A* e *a* foram mantidas em meios de cultura conforme segue*: (a) estágio leveduriforme — 3,0 g de Bacto extrato de levedura; 3,0 g de extrato de malte Difco; 5,0 g de Bacto peptona; 10,0 g de Bacto dextrose; 20,0 g de Bacto agar; 1.000 ml de água destilada; (b) estágio de frutificação (cruzamento) — 1,25 g de feno autoclavado durante 7 min em 1.000 ml de água destilada, seguido de filtragem em gaze e reestabelecimento do volume final de 1.000 ml com água destilada; 1,4 g K₂PO₄; 20,0 g de agar. Os meios foram autoclavados durante 15 min e despejados em placas de Petri nas quais as culturas foram desenvolvidas.

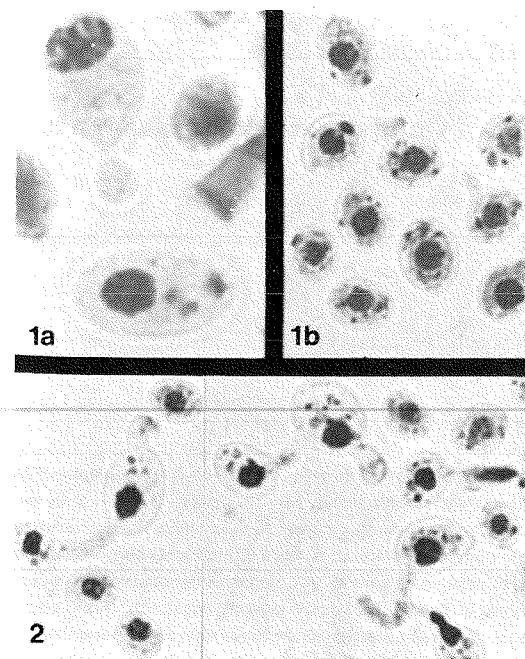
A técnica HCl-Giemsa para a coloração nuclear, já descrita(3), foi utilizada nos seguintes tempos; 20 min para a fixação; 3-5 min em cada passagem pelos banhos de álcool, exceto em álcool 70, no qual foi aguardado até que o material submergisse; 10 min na água destilada para lavagem; 8-10 min para a hidrólise à temperatura ambiente e 7-8 min para a hidrólise a 60-63°C; 4 trocas de 5 min em cada passagem pela água destilada; 30 min em tampão a pH 6,9-7,0; 20-90 min na solução corante.

Resultados

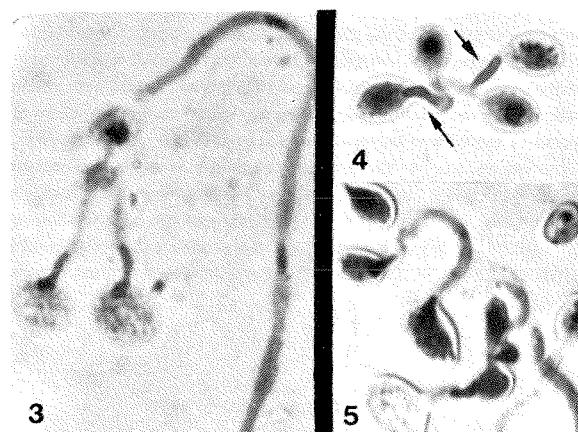
Estágio monocariótico — O estágio monocariótico de *F. floriforme* é representado por células leveduriformes elípticas, uninucleadas que esporulam intensamente (Fig. 1). As características gerais destas células já foram mencionadas na descrição original do fungo(7).

Processo de dicariotização — Quando células geneticamente compatíveis são colocadas em contiguidade, a migração nuclear se estabelece e o processo de dicariotização se inicia. Isto pode envolver dois, três, quatro ou mais (até sete) monocariontes leveduriformes (Fig. 2-4), com a formação de um tubo de fusão ou de conjugação que emerge de área indeterminada das células participantes. Uma das células pode atuar como receptora de núcleo, ao passo que outra (ou outras) age como doadora (Fig. 2-4). Alternativamente, núcleos de ambos conjugantes iniciam o processo de migração (Fig. 5).

Apesar de incompletamente documentado, o processo de dicariotização sugere as seguintes alternativas: (a) ambas as células leveduriformes *A* e *a* são capazes de produzir o tubo de fusão, sem predeterminação de área especial da célula a partir da qual o tubo se origina; (b) usualmente, o tubo é de crescimento limitado, embora crescimento mais extenso possa ser observado (Fig. 5); (c) parece existir migração nuclear preferencial por um dos participantes sem que tivesse sido investigado, contudo, o provável controle genético na diferenciação de



Figs. 1, 2 — Dicariotização em *Filobasidium floriforme*. Fig. 1. Células leveduriformes uninucleadas, monokárticas, elípticas, em blastospólio; a, 3600X; b, 2000X. Fig. 2. Tubos de conjugação entre pares de monokártontes; 2000X.

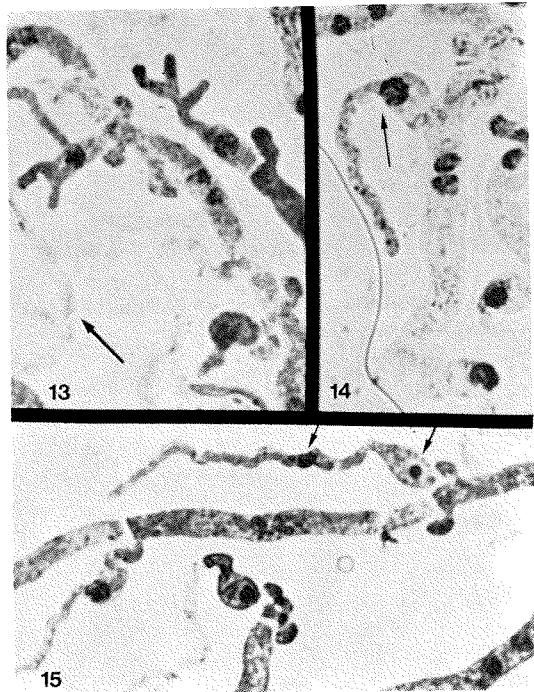


Figs. 3-5 — Dicariotização em *Filobasidium floriforme*. Fig. 3. Conjugação entre uma célula leveduriforme de um dos padrões de sexualidade e duas outras compatíveis; 1700X. Fig. 4. Participação de quatro células monokárticas, duas-a-duas, sendo que em cada par uma célula atua como doadora e outra como receptora de núcleo; 2000X. Fig. 5. Dicariotização ocorrendo simultaneamente à divisão nuclear assíncrona com formação de ansa ("clamp-connection"); 2000X.

células doadoras e receptoras de núcleo; (d) o início da dicariofase é marcado pela formação de ansa ("clamp-connection") nos septos, com algumas figuras revelando que divisões nucleares assíncronas podem ser concomitantes com a formação do gancho da ansa (Fig. 5-6); (e) estágios subseqüentes, no desenvolvimento da hifa, levam à produção de micelio dicártico, com ansa, cujas hifas são formadas por segmentos celulares predominantemente binucleados, em especial os terminais (Fig. 7).

* Receitas fornecidas gentilmente por Dr. L.S. Olive.

Estágio dicariótico — A dicariofase em *F. floriforme* está representada por hifas bem desenvolvidas cujos segmentos são predominantemente binucleados, com ansas nos septos (Fig. 8), embora segmentos multinucleados possam ser encontrados (Fig. 9-10). Há predominância de crescimento axial, embora o desenvolvimento lateral não seja incomum (Fig. 11). Todavia, as ramificações são usualmente caracterizadas por segmentos curtos, de base bulbosa e com número variável de expansões delgadas, em geral irregulares. Tais estruturas correspondem aos ramos “haustorióides” descritos por Olive(7).



Figs. 13-15 — Formação de ramos haustorióides em *Filobasidium floriforme*. Fig. 13. Ranhos haustorióides de origem terminal e lateral, com indicação de degeneração nuclear e colapso celular (seta); 2000X. Fig. 14. Ramificação hifálica monocariótica, com afilamento da terminação, sugerindo a ramificação haustorióide (seta); 2000X. Fig. 15. Ramificação haustorióide com base bulbosa conspícuia e extensão hifálica afilada, na condição binucleada (setas) e monocariótica (uninucleada); 2000X.

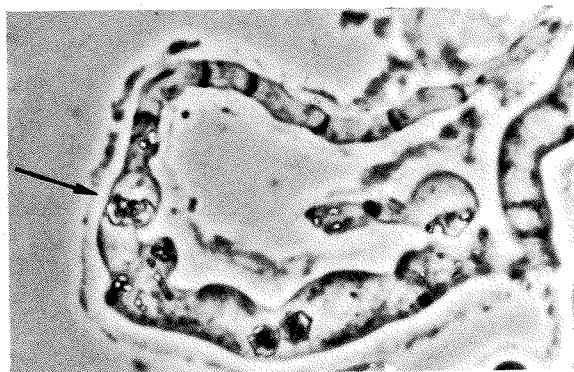
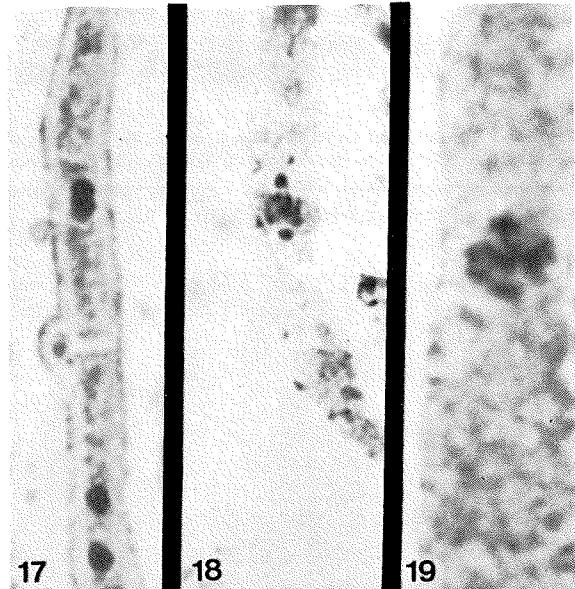


Fig. 16 — Ramificação haustorióide em *Filobasidium floriforme* uninucleada (seta) e com formação de pseudoseptos; contraste de fase; 2000X.

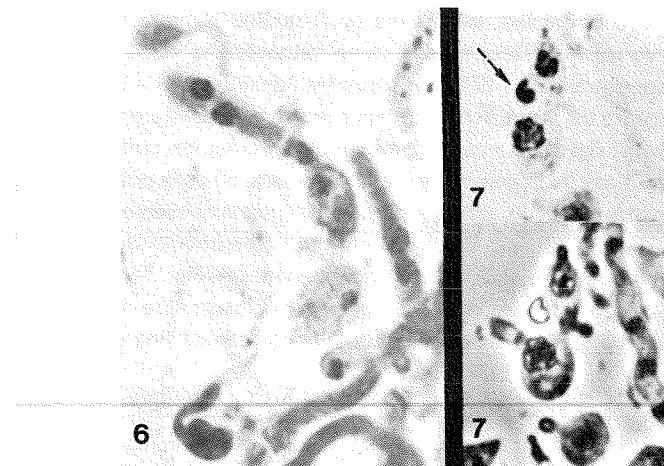
Divisão nuclear assíncrona pode ocorrer durante o crescimento hifálico, resultando na formação das células uninucleadas (Fig. 12-13) e, consequentemente, no rompimento da condição dicariótica e retorno à monocariofase. A desdicariotização também pode se dar em consequência da degeneração de um dos dois núcleos que formam o dicário, como é sugerido em várias observações (Fig. 13), ou simplesmente pelo crescimento de ramificações uninucleadas, monocarióticas (Fig. 14). As ramificações monocarióticas exibem crescimento limitado, base bulbosa próxima ao septo, parede fina e



Figs. 17 a 19 — Estágio basidial em *Filobasidium floriforme*. Fig. 17. Estágio diplóide; 1700X. Fig. 18. Anafase I com corpos centriolares polares; 2000X. Fig. 19. Estágio intermediário paquitenodiplóteno da Divisão I; 4100X.



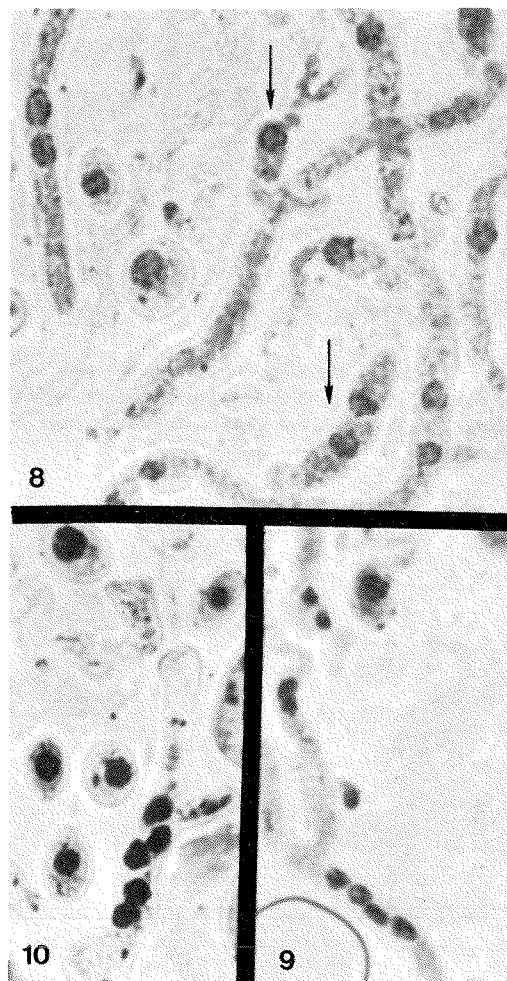
Fig. 20 — Ápice do basídio em *Filobasidium floriforme*, com oito basidiospores sésseis, uninucleados; 2000X.



Figs. 6, 7 — Dikaryotização em *Filobasidium floriforme*. Fig. 6. Desenvolvimento de ansa simultâneo ao processo de dikaryotização; em campo claro (a) e contraste de fase (b); 2000X. Fig. 7. Primeiro segmento hifálico dicariótico, formado após à dikaryotização; 2000X.



Fig. 11 — Hifas dicarióticas, ramificadas, em *Filobasidium floriforme*; interferência de Nomarski; 2000X.



Figs. 8-10 — Estágio dicariótico, hifálico, em *Filobasidium floriforme*. Fig. 8. Hábito hifálico ramificado e ramo haustorióide; 2000X. Fig. 9. Segmento hifálico tetranucleado em vias de receber outro núcleo conduzido pelo gancho da ansa; 2000X. Fig. 10. Segmento hifálico pentanucleado; 2000X.



Fig. 12 — Comportamento nuclear nas hifas de *Filobasidium floriforme*, com divisão conjugada no segmento terminal e subterminal, e divisão assíncrona com formação de ramificação monocariótica (seta); contraste de fase; 2000X.

terminações afiladas, com sinais de colapso celular (Fig. 15-16).

São estruturas predominantemente laterais, embora possam ser formadas nas terminações hifálicas (Fig. 13-16).

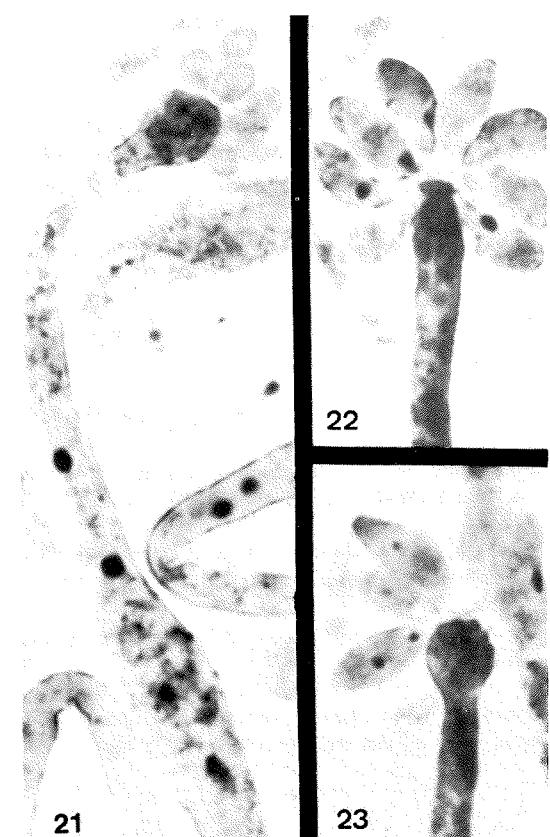
Estágio basidial — A célula basidial é asseptada, subcilíndrica nos estágios iniciais, passando a formar, progressivamente, ápice ampliado. O citoplasma torna-se mais denso do que nas hifas vegetativas, após a coloração (Fig. 17).

A seqüência meiótica não foi totalmente documentada, mas os seguintes estágios podem ser destacados: na anafase I, os corpos centriolares tornam-se conspícuos (Fig. 8); o reduzido tamanho do núcleo diplóide torna a contagem de cromossomos insegura, mesmo em figuras interpretadas como fim de paquíteno ou início de diplóteno (Fig. 19). No final da segunda divisão meiótica a célula basidial fica com quatro núcleos. Em seguida, ocorre a divisão mitótica, culminando com a condição final do basídio com oito núcleos. Todavia, não foi determinado se isto ocorre ao longo do eixo do basídio ou na região apical expandida.

Os basidiosporos ficam ligados diretamente na região expandida do basídio, sem a presença de esterigma conspícuo (Fig. 20). A indução de oito primórdios de basidiosporos pode ocorrer antes que a mitose pós-meiótica tenha acontecido, quando o basídio contém apenas quatro núcleos (Fig. 21).

Alguns desvios na seqüência meiose-mitose pós-meiótica podem ocorrer. Um basídio com oito esporos apresenta apenas quatro de seus esporos contendo um núcleo cada, ficando os demais esporos anucleados (Fig. 22). Não pôde ser determinado se houve, entretanto, mitose pós-meiótica seguida de degeneração de quatro dos oito núcleos resultantes. Outro caso de des-

vio é representado pela formação de esporos binucleados, embora não tivesse sido determinado se a condição era monocariótica ou dicariótica (Fig. 23).



Figs. 21-23 — Comportamento nuclear no basídio de *Filobasidium floriforme*. Fig. 21. Indução de oito primórdios de basidiosporos em basídio tetranucleado (final da meiosé); 2000X. Fig. 22. Produção de oito basidiosporos, dos quais apenas quatro recebem núcleo; 2000X. Fig. 23. Produção de basidiospore binucleado; 2000X.

Discussão

Quando o *Filobasidium floriforme* foi descrito(7), a espécie foi considerada, ao invés de forma primitiva, um derivado avançado de ancestral relativo aos membros de *Tilletia*, com diversas características de *Entyloma*, a saber: basídios longos, asseptados, ausência de probasídios (teliosporos) de parede espessada, produção de basidiosporos sésseis, micélio com hifas dotadas de ansas ("clamp-connections"), e a evidência de algum grau de parasitismo (micoparasitismo). Embora o fungo tivesse sido considerado afim a Ustilaginales, suas características foram interpretadas como suficientemente distintas para o estabelecimento de um novo gênero e família (Filobasidiaceae).

Posteriormente, foram feitas novas adições, representadas pela nova espécie *Filobasidium capsuligenum* (6) e o novo gênero *Filobasidiella*, tipificado por *F. neoformans*(5). O último táxon distingue-se de *Filobasidium* pela produção de basidiosporos em cadeias basipétalas, por brotamento em repetição. As características do processo de dicariotização e de formação de hifas em linhagens de *Cryptococcus laurentii* (Kuff.) Skinner foram consideradas similares às exibidas pelos representantes de *Leucosporidium*, *Rhodosporidium* e *Filobasidium*(4). A principal distinção está na ausência de ansa nas hifas que caracterizam o estágio micelial de *C. laurentii*. Tais linhagens foram consideradas afins a heterobasidiomi-

cetos leveduriformes, muito embora o ciclo biológico completo não tivesse sido demonstrado.

Apesar das incertezas evolucionárias e taxonômicas nos fungos(8), a família Filobasidiaceae parece ter tido sua condição taxonômica consolidada entre Ustilaginales, juntamente com as duas outras famílias, Ustilaginaceae e Tilletiaceae.

Filobasidium floriforme apresenta vários aspectos de importância. Do ponto de vista citológico, é possível que os fenômenos que conduzem à formação do dicário e a tendência de retornar à condição monocariótica em *F. floriforme* (e provavelmente em outros membros da

família) venham a ser de considerável interesse para estudos que abordam a importância evolutiva e taxonômica da ansa(2). O desenvolvimento do basídio nos membros de Filobasidiaceae, por sua vez, deverá merecer consideração especial, para aqueles que se preocupam com o estabelecimento de maior uniformidade na terminologia dos basídios(9) ou com o melhor entendimento dos aspectos filogenéticos ligados à morfologia basidial(1). O conspícuo dimorfismo genético constitui, indiscutivelmente, aspecto de grande relevância para os que se interessam pelos processos de polarização de organelas envolvidas no crescimento celular dos fungos.

Referências Bibliográficas

1. CHADEFAUD, M. — Sur la valeur morphologique de la baside. *C.R. Acad. Sc. Paris*, ser. D, 280: 165-168, 1975.
2. FURTADO, J.S. — Significance of the clamp-connection in the Basidiomycetes. *Personia*, 4:125-144, 1966.
3. FURTADO, J.S. — Basidial cytology of *Exidia nucleata*. *Mycologia*, 60:9-15, 1968.
4. KURTZMAN, C.P. — Formation of hyphae and chlamydospores by *Cryptococcus laurentii*. *Mycologia*, 65:388-395, 1973.
5. KWON-CHUNG, K.J. — A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, 67:1197-1200, 1975.
6. MIRANDA, L.R. de — *Filobasidium capsuligenum* nov. comb. *Antoine van Leeuwenhoek*, 38:91-99, 1972.
7. OLIVE, L.S. — An unusual new heterobasidiomycete with *Tilletia*-like basidia. *J. Elisha Mit. Sci. Soc.*, 84:261-266, 1968.
8. SHAFFER, R.L. — The major groups of Basidiomycetes. *Mycologia*, 67:1-18, 1975.
9. TALBOT, P.H.B. — Towards uniformity in basidial terminology. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 61:497-512, 1973.

Linhagem rara de *Escherichia coli* indol-negativa e produtora de H₂S

Marcelo Magalhães & Adelma Véras*

Resumo

Descrição da linhagem rara de *Escherichia coli*, pertencente ao sorotipo 039:H₂S. Seu comportamento bioquímico é típico da espécie, com exceção da indol-negatividade e produção de H₂S. Assim, ela simula cepas lactose-positivas de *Salmonella*, nos meios de triagem usados em enterobacteriologia.

Summary

Unusual strain of indol-negative and H₂S-producing Escherichia coli.

An unusual strain of *Escherichia coli*, belonging to serotype 039:H₂S is characterized. Its biochemical behaviour is typical for the species except for the indol-negative and H₂S-producing characters. In enteric screening media it mimics lactose-positive strains of *Salmonella*.

O isolamento de enterobactérias que apresentam características bioquímicas excepcionais, geralmente plasmídio-dependentes, dificultando seu enquadramento nos esquemas clássicos de identificação, tem, por motivos óbvios, proporcionado crescente interesse em microbiologia clínica. Exemplos dessas linhagens atípicas são as salmonelas lactose-positivas endêmicas em São Paulo (Pessôa, G.V.A., *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 33:13-28, 1973), salmonela produtora de urease (Farmer III, J.J. & col., *J. Clin. Microbiol.*, 1:106-107, 1975) e cepas de *Escherichia coli* produtoras de H₂S (Lautrop, H. & col., *Acta path. microbiol. scand.*, B, 79:641-650, 1971), ou de urease (Washington II, J.A. & Maker, M.D., *J. Clin. Microbiol.*, 2:70-71, 1975).

Neste trabalho é descrita uma linhagem rara de *E. coli* que, além de indol-negativa, produz H₂S nos meios de triagem usados em enterobacteriologia, podendo, portanto, ser facilmente confundida com as variantes lactose-positivas de *Salmonella typhimurium*, freqüentes em São Paulo.

A cepa de *E. coli* PE-1818, objeto deste artigo, foi isolada de fezes diarréicas de uma criança de 5 anos, na ausência de qualquer enterobactéria patogênica. Nas placas de agar Hektoen (Difco), inoculadas diretamente, as colônias apresentaram-se amareladas, com o centro negro. Nos meios de triagem, agar tríplice açúcar-ferro (Difco) e lisina-ferro motilidade (Merck), portando o papel indicador da produção de indol, tiveram comportamento idêntico ao apresentado pelas arizonas e salmonelas lactose-positivas. Entretanto, como a cultura não pôde ser

também isolada no agar verde brilhante, após enriquecimento das fezes em caldo tetratônato, a suspeita inicial de salmonela lactose-positiva foi afastada e uma série completa de testes bioquímicos foram realizados (Edwards, P.R. & Ewing, W.H. — Identification of enterobacteriaceae. 3rd ed. Burgess Publishing Co. Minneapolis, 1972). A cultura foi, desta maneira, indentificada como *E. coli* indol-negativa e produtora de H₂S, sendo enviada ao Communicable Disease Center, onde tomou o número 76-065168, para tipificação sorológica. O sorotipo encontrado, 039:H₂S, mostrou que a cultura não pertence aos tipos enteropatogênicos clássicos ou invasivos de *E. coli*.

Estudos genéticos demonstraram que a produção de H₂S nesta linhagem é dirigida por um plasmídio conjugativo, ligado à marca responsável pela fermentação da rafinose. Este plasmídio, pPE1818 (Hys-Raf), do mesmo modo que outros plasmídios Hys-Raf, isolados no Recife (resultados não publicados), pertence ao grupo de incompatibilidade F1. Desse modo, embora testes para enterotoxigenicidade não tenham sido realizados, a posse de um plasmídio pertencente ao mesmo grupo de incompatibilidade do plasmídio Ent (Santos, D.S. & col. *J. Bacteriol.*, 124:1240-1247, 1975) indica, fortemente, que a cultura não poderia ser enterotoxinogênica.

Como pode ser observado na Tabela 1, a amostra PE-1818 apresenta notável semelhança de comportamento bioquímico com as variantes lactose-positivas de *S. typhimurium*, prevalentes em São Paulo. Portanto, precauções devem ser tomadas nos laboratórios de micro-

*Centro de Ciências da Saúde, Microbiologia Médica, Cidade Universitária 50000 Recife, Brasil

biologia clínica, especialmente naqueles localizados em áreas onde as salmonelas lactose-positivas são freqüentes, para evitar a confusão entre tais culturas e linhagens H₂S-positivas de *E. coli*.

Somos gratos a D.J. Brenner pela tipificação sorológica da linhagem.

ERRATA:

Volume 7(1) página 5 – figs. 1, e 2

AUTORES:

Marcelo Magalhães e Adelma Véras

TÍTULO:

"Ineficácia da tobramicina in vitro sobre Pseudomonas gentamicina-resistentes".

Figuras 1 e 2 estão invertidas em relação às legendas; 6 amostras a mais foram inadvertidamente adicionadas no 1º quadro superior à esquerda da fig. 2 (que na realidade deveria ser fig. 1), durante a confecção da Revista.

Tabela 1

Comparação entre *E. coli* PE-1818 e variantes lactose-positivas de *S. typhimurium*

Teste ^a	<i>E. coli</i> PE-1818	<i>S. typhimurium</i> ^b
Indol	—	—
Vermelho-metilá	+	+
Voges-Proskauer	—	—
Citrato (Simmons)	—	+
H ₂ S	+	+
Urease	—	—
KCN	—	—
Motilidade	+	+
Gelatinase	—	—
Lisina	+	+
Ornitina	+	+
Fenilalanina	—	—
Malonato	—	—
Acetato de sódio	+	+
Glicose (gás)	+	+
Lactose	+	+
Sacarose	+	—
Manitol	+	+
Dulcitol	+	+
Salicina	+	—
Adonitol	—	—
Inositol	—	+
Sorbitol	+	+
Arabinose	+	+
Rafinose	+	—
Ramnose	+	+
Trealose	+	+
Xilose	+	+
Glicerol	+	+

^a + reação positiva dentro de 48 h

— reação negativa

^b segundo Pessôa, G.V.A. (*Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33:13-28, 1973)

Isolamento do vírus da mamilite herpética bovina no Brasil*

Fúlvio José Alice**

Resumo

Um vírus, designado Sta. 0/700, foi isolado no curso de uma epizootia e se caracterizou pela formação de vesículas e úlceras nas tetas de vacas leiteiras e lesões no focinho de bezerros lactentes. O agente foi obtido em culturas primárias de rim fetal bovino (RFB), inoculadas com a emulsão do tecido vesicular de um dos animais. O vírus proliferou em RFB, induzindo a produção de grandes sincícios, notando-se inclusão eosinofílica do tipo A-Cowdry em muitos núcleos. A proliferação e respetivos fenômenos ocorreram em outros sistemas celulares de origem bovina. A inoculação em cobaias, coelhos e camundongos neonatos ocasionou lesões cutâneas próprias. Entretanto, não houve evidência de multiplicação ou de lesões em embriões de galinha. O vírus não mostrou atividade hemaglutinante ou hemadsorvente. Trata-se de vírus ADN, lável ao éter etílico, clorofórmio, a pH 3,0 e ao aquecimento a 50°C por 30 min. Conclui-se que o isolado é idêntico ou intimamente relacionado com o vírus da mamilite herpética bovina (MHB) pelas características exibidas, a resposta dos animais de laboratório à infecção experimental e pelas provas cruzadas de neutralização e de imunidade. Esta é a primeira vez em que o agente causal da MHB foi assinalado, no Brasil, cuja presença já foi registrada no Reino Unido, EUA, Itália, Bulgária e Austrália. É possível que o patógeno tenha passado despercebido, não obstante seu significado para a produção leiteira.

Summary

Isolation of bovine herpes mammillitis virus in Brazil

A virus designed Sta. 0/700 was isolated during an outbreak of a vesicular and ulcerative condition affecting the teats of dairy cows and lesions in the muzzle of suckling calves. The virus was recovered in primary bovine embryonic kidney (BEK) cell cultures inoculated with emulsion of a vesicular tissue from a host. The virus proliferates in BEK giving rise to large syncytia with many nuclei containing Cowdry-type A inclusion. The virus also grows in different bovine cell systems. Guinea-pigs, rabbits and baby mice inoculated with the isolate showed characteristic skin lesions but the virus failed to grow or to produce lesions in chicken embryos, and has no hemagglutination and hemadsorption activity. It is a DNA virus sensitive to ethyl ether, chloroform, to pH 3.0 and was inactivated at 50°C for 30 minutes. On the basis of the virus properties, the response of laboratory animals to experimental infection, the cross neutralization and immunity tests, it was concluded that the virus is similar or closely related to the bovine herpes mammillitis (BHM) agent. This is the first report of the BHM virus for Brazil, the agent having been recorded first from UK and subsequently from USA, Italy, Bulgaria and Australia.

Introdução

O vírus da mamilite herpética bovina (MHB) foi verificado primeiramente em 1963, no Reino Unido, por Martin & col. (18, 19), que o isolaram de lesões ulcerativas da pele das tetas de vacas leiteiras. Posteriormente, ainda no Reino Unido, o mesmo agente foi encontrado por outros pesquisadores, não só em casos de mamilite, mas também de gangrena da pele do úbere, lesões do focinho, face e língua de bezerros lactentes (5, 6, 10, 11, 16, 25). O agente foi identificado como herpesvírus, distinto de outros do mesmo grupo, tanto de origem humana quanto

de animal (3, 19, 20, 22), excetuando-se o Allerton, com o qual se relaciona, cultural e imunologicamente (3, 20). Vários autores estudaram a epizootiologia da mamilite, a patogenia do vírus para bovinos e animais de laboratório, bem como suas propriedades culturais, sorológicas e estruturais (3, 9-12, 19-21, 23, 26-29).

Na Europa, além do Reino Unido, o vírus foi assinalado na Itália (3) e Bulgária (7). Sua ocorrência, entretanto, não se limita ao Velho Mundo: um agente idêntico, ou a ele relacionado, foi verificado nos Estados de Min-

* Trabalho realizado no Instituto Biológico da Bahia. 40.000. Salvador. Bahia. Brasil.

Resumo apresentado ao VI Congresso Brasileiro de Microbiologia. Salvador. BA., 27 a 31 de julho de 1975.

** Professor Titular. Escola de Medicina Veterinária. Universidade Federal da Bahia (UFBA.). Salvador. Bahia.

Pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 20.000 Rio de Janeiro, RJ. Brasil.

nesota (36) e New York (35) nos EUA, Austrália (33) e, agora, no Brasil.

Neste trabalho são apresentados os resultados relativos ao isolamento e identificação de um agente que se revelou idêntico ou intimamente relacionado com o vírus da MHB. O material, denominado Sta. 0/700, foi obtido do tecido vesicular das tetas de uma vaca leiteira.

Material e Métodos

Origem e processamento do material — No curso de uma epizootia em rebanho de vacas leiteiras, foram coletadas amostras das lesões localizadas nas tetas de três animais. Duas foram obtidas com auxílio de aplicadores e uma constituída de porções de tecido das vesículas de outro animal. No laboratório, os aplicadores foram vigorosamente agitados em meio nutritivo sem soro. Os fragmentos do tecido foram cortados com tesoura, triturados em gral e emulsionados na proporção de 10%, no mesmo veículo. As emulsões foram centrifugadas a 2.000 rpm, por 10 min, em centrífuga refrigerada a 5°C e ao sobre-nadante, adicionou-se antibióticos. Após 30 min de incubação em geladeira, cada preparação foi inoculada em seis tubos de culturas primárias de rim fetal bovino, na dose de 0,2ml por tubo. As culturas tratadas ficaram em temperatura ambiente, pelo período de 30 min, para adsorção, findo o qual foi completado o meio nutritivo para 1ml e os tubos transferidos para estufa a 36-37°C. Para controle, fez-se cultura das suspensões em caldo tioglicolato (Difco).

Cultura de tecido — As culturas primárias de células renais de feto bovino (RFB) foram preparadas mediante extração dos fragmentos da córtice pela tripsina a 0,25% em solução salina tamponada, sendo as extrações processadas durante a noite, em geladeira. As células foram cultivadas em meio nutritivo constituído de solução salina balanceada de Hank's, com 0,5% de hidrolisado de lactalbumina; 0,1% de extrato de levedo; 10% de soro de vitelo e antibióticos — penicilina, estreptomicina e amfotericina B. Entre o segundo ou terceiro dia de incubação a 36-37°C, renovava-se o meio, empregando-se outro que continha as mesmas substâncias, exceto a solução de Hank's, que era substituída pela de Earle. O meio de manutenção compunha-se de solução salina de Earle com os mesmos elementos do meio de crescimento, omitindo-se, porém, o soro (ELL). Além do RFB, foram ensaiados outros sistemas celulares: testículo de feto bovino em cultura primária e de baixa passagem (TB); pulmão de feto bovino de baixa passagem; cultura continua de rim bovino (MDBK); rim de macaco reso (LLC-MK2) e rim suíno (IB-RS2).

Formação de placas — Culturas de RFB, em garrafas do tipo "milk dilution", depois de lavadas três vezes com

solução de Hank's, receberam 1 ml da suspensão do vírus diluída de 10^{-1} a 10^{-1} . Depois de 60 min de adsorção, em incubador a 36-37°C, removeu-se o material inoculado e as culturas foram cobertas com meio nutritivo composto de solução de Earle com 1,5% de agar "Difco", hidrolisado de lactalbumina e extrato de levedo, nas proporções referidas acima; 5% de soro de cavalo, inativado por 30 min a 56°C e 3% de bicarbonato a 7,5% em água. Após a solidificação do meio, as garrafas retornaram ao incubador, onde permaneceram em posição invertida. No terceiro ou quarto dia de incubação, adicionou-se, a cada garrafa, 10ml de formol diluído a 10% em água destilada, cuja solução foi decantada 30 min depois, juntamente com o agar. Cada garrafa recebeu 1ml de cristal-violeta a 1:2.000 em água destilada, distribuindo-se o corante uniformemente sobre a cultura. Decorridos 20 min, a solução foi decantada, as garrafas lavadas 3-4 vezes com água destilada e, então, examinadas.

Hemaglutinação e hemadsorção — As provas de hema glutinização (HA) e hemadsorção (HAD) seguiram os métodos de Salk (30) e de Shelokow & col. (32), respectivamente, tendo sido ensaiados eritrócitos de cobaio, coelho, carneiro, galinha e humano do tipo "O". As leituras dos testes foram feitas depois de 1-2h de incubação, em temperatura ambiente ou em geladeira a 5°C.

Características físico-químicas — a) *ação do éter etílico e do clorofórmio*. O efeito do éter etílico e do clorofórmio sobre o vírus foi examinado de acordo com os métodos de Andrewes & Horstmann (2) e de Feldman & Wang (8), respectivamente. Nestas provas, procedeu-se à titulação do vírus tratado e do não tratado; b) *sensibilidade ao pH 3,0* — a amostra em estudo foi examinada quanto à sua sensibilidade ao pH 3,0, empregando-se o tampão fosfato de sódio-ácido cítrico de McIlvaine. A 1ml da suspensão do vírus obtida de culturas infectadas, foi adicionado igual volume do tampão no pH desejado, procedendo-se à titulação da mistura depois de três horas de permanência em temperatura ambiente. Os controles da prova incluíram: amostra da mesma suspensão do vírus, adicionada de igual volume de água tridestilada; um vírus sensível e outro resistente ao pH ácido; c) *sensibilidade ao calor* — 1 ml do líquido infectante de cultivo em RFB foi colocado no fundo de um tubo de hemólise, tornando-se a precaução de flambá-lo a 2 cm da extremidade superior. Depois de resfriado, transferiu-se o tubo para o banho-maria a 50°C. Ao final de 30 min, o tubo foi resfriado rapidamente em banho de água com cubos de gelo e, em seguida, o vírus titulado; d) *tipo do ácido nucleico* — na determinação do tipo do ácido nucleico da amostra em estudo, foi empregada a 5-iodo-2'-desoxiuridina (IDUR)*, um inibidor da síntese do ácido desoxirribonucleico (13). O vírus foi diluído na concentração

* Sigma Chemical Company. St. Louis. Mo. USA.

aproximada de 500 DICT₅₀ em ELL com IDUR, na proporção de 35 µg/ml. Tubos de culturas, previamente lavados com Hank's, receberam 1ml da preparação do vírus. Após 3h de incubação a 36-37°C procedeu-se à substituição do material inoculado por igual volume do meio de manutenção que continha apenas IDUR e as culturas foram reincubadas à mesma temperatura. Como controle do vírus, foram empregadas culturas que receberam a suspensão do vírus igualmente diluído, mas sem o inibidor. Finalmente, dois outros tubos de cultivo foram inoculados com o mesmo volume de meio nutritivo com o IDUR. Serviram como testemunha da prova um vírus ADN e outro ARN. Quando o CPE atingiu ao máximo, nos tubos controles do vírus, as culturas infectadas foram congeladas a -70°C, descongeladas, centrifugadas para clarificação e tituladas.

Animais de experimentação — A suspensão do vírus, entre a sétima e oitava passagens em culturas de RFB, foi inoculada, por diferentes vias e doses, em cobaias, coelhos e camundongos adultos e neonatos. a) *Cobaias*. Cada um de oito cobaias recebeu 0,2ml da suspensão virulenta por via intradérmica (ID) no flanco. A mesma dose foi aplicada por via intradérmo-plantar (IDP) em nove outros animais, compreendendo seis machos e três fêmeas gestantes, tendo sido incluída outra cobaia grávida à qual se aplicou meio nutritivo na mesma dose e via. b) *Coelhos*. Dois coelhos de quatro meses de idade receberam 0,5ml do vírus por via venosa (IV) e a dois outros, da mesma idade, aplicou-se 0,3ml por via ID. c) *Camundongos*. Camundongos adultos foram inoculados pelas seguintes vias: intracerebral (IC), intraperitoneal (IP), subcutânea (SC) e ID, nas doses de 0,03ml, 0,25ml, 0,2ml e 0,05ml, respectivamente. Camundongos lactentes, de 0-1 dia de idade, receberam o vírus por via SC, IP e IC, nas doses de 0,1ml, 0,05ml e 0,02ml.

Embriões de galinha — Um lote de 12 ovos de galinha embrionados, com 10 dias de idade, foi dividido em dois grupos de seis cada. O primeiro recebeu o vírus na dose de 0,2ml, na membrana alantóide, e o outro, no mesmo volume, na cavidade alantólica. A partir do quarto dia após a inoculação, sacrificaram-se dois embriões de cada grupo, retirando-se os líquidos embrionários e o próprio embrião. Os líquidos embrionários foram diluídos na proporção de 1:5, em meio nutritivo, as diluições centrifugadas e inoculadas em culturas de RFB. Dos embriões, removiam-se as pernas, cabeça e asas e o restante era triturado em gral, emulsionado na proporção de 1:10 em meio nutritivo, a emulsão centrifugada e o sobrenadante inoculado em cultivos de RFB. Dos embriões, removiam-se as pernas, cabeça e asas e o restante era triturado em gral, emulsionado na proporção de 1:10 em meio nutritivo, a emulsão centrifugada e o sobrenadante inoculado em cultivos de RFB.

Preparação de soros imunes — Foram preparados, no laboratório, soros imunes contra os seguintes vírus: rinotraqueite infecciosa bovina (RIB); pseudo-raiva (PR) e mamilite herpética bovina (MHB) — amostra TVA —

(26). O soro contra a RIB foi obtido de coelhos e o anti-PR, de frangos. Os soros anti-MHB e contra a estirpe em estudo (Sta. 0/700) eram originários de cobaias. Cada animal recebeu quatro inoculações do vírus da sétima e oitava passagens em cultura de RFB, sendo a primeira aplicada pela via ID, no flanco, ou IDP, na dose de 0,2ml. Vinte dias depois, praticou-se a segunda injeção, no volume de 0,5ml, por via IM; transcorridos 10 dias, cada animal recebeu a terceira inoculação, na dose de 1ml, pela mesma via. Finalmente, a quarta aplicação do vírus foi feita quatro dias depois, também por via IM e no mesmo volume. Decorridos 12 dias da última inoculação, todos os cobaios foram sangrados por punção cardíaca, o soro separado por centrifugação e inativado a 56°C, por 30 min. De todos os animais empregados na preparação de soros imunes, coletou-se sangue antes do processo de imunização. Os soros foram separados como referido acima e examinados para comprovação de anticorpos. Os soros anti-RIB e anti-PR, também, titulados antes de serem usados nas provas de neutralização.

Identificação do vírus — a) *Provas de neutralização*. Na execução dos testes de neutralização foi adotado o método de soro constante e vírus diluído. Diluições decimais do vírus foram preparadas em ELL, sendo a primeira a 1:5 × 10⁻¹ e a última a 1:5 × 10⁻⁷. Os soros, imunes ou normais, foram diluídos em ELL, na proporção de 1:5. Em seguida, transferia-se 0,5ml de cada diluição decimal do vírus para tubos de hemólise e, a cada um deles, foi adicionado igual volume do soro imune diluído. Em outra série de tubos de hemólise, 0,5ml de cada diluição do vírus foi misturada com igual volume de soro obtido dos mesmos animais, antes de serem imunizados. As misturas soro-vírus, depois de agitadas por alguns minutos, foram incubadas em banho-maria, a 37°C, por 60 min e, em seguida, transferidas para o banho de água gelada, onde permaneceram por igual período. Terminado o período, as misturas foram novamente incubadas à mesma temperatura por alguns minutos e, então, inoculadas em tubos de cultivos de RFB. Cada tubo recebeu 0,2ml da mistura soro-vírus, utilizando-se dois tubos para cada diluição. Terminada a operação, completava-se o volume de cada tubo para 1ml com ELL e as culturas foram incubadas a 36-37°C. As leituras finais foram feitas após 6-7 dias de incubação e o índice neutralizante 50% (IN₅₀) foi calculado pelo método de Reed & Muench (24).

As provas com os soros anti-RIB e anti-PR foram realizadas em sentido único, enquanto que os testes com as amostras TVA e Sta. 0/700 foram recíprocas: o soro anti-Sta. 0/700 reagiu com o vírus homólogo e com o TVA; na prova inversa, o soro anti-TVA foi misturado com o vírus homólogo e com a estirpe em estudo. b) *Provas de imunidade cruzada*. Nestas provas, foram examinados apenas os vírus TVA e Sta. 0/700, utilizando-se cobaias imunizados pelo processo referido em "preparação de soros imunes". Cada animal recebeu 0,2ml da suspensão

de vírus não diluído, que foi aplicada pela via ID, no flanco oposto ao da primeira inoculação. A um grupo de seis cobaia, imunizados com o vírus Sta. 0/700, 15 dias depois da última dose, injetou-se o TVA; a outro grupo de cinco animais, imunizados com o vírus TVA, foi aplicado o Sta. 0/700. Os controles destas provas incluíram dois cobaia imunes e dois normais para cada vírus.

Resultados

Isolamento do vírus — As culturas inoculadas com o material dos aplicadores não acusaram modificações celulares, tendo sido desprezadas 8 a 10 dias depois. Entretanto, os seis tubos que receberam o extrato do tecido das vesículas revelaram modificações discretas após 48-72 horas, reações que evoluíram rapidamente, completando-se entre 24-48 horas seguintes. As culturas foram congeladas e descongeladas uma vez, o meio nutritivo coletado e centrifugado ligeiramente para clarificação. Desse material, fez-se passagem em culturas de RFB, que revelaram efeito citopático (ECP) no dia imediato ao da inoculação. Nos controles do material original e das culturas não houve desenvolvimento bacteriano. Nas passagens seguintes, os resultados foram idênticos, sugerindo que um agente viral havia sido isolado do material das vesículas.

O ECP, dependendo da dose empregada, era evidente entre 12 e 36 horas após a inoculação. Caracterizou-se, a princípio, pelo aparecimento de focos discretos de massas celulares que aumentavam em número e área, à medida que se prolongava a incubação; tornaram-se confluentes, estendendo-se por todo o tapete celular, que terminou desprendendo-se das paredes do tubo. Frequentemente, observavam-se formações globulosas ligadas ao remanescente da cultura ou flutuando livremente no meio nutritivo. O processo degenerativo completou-se com a destruição total do estrato celular entre 24 e 72 horas. Os títulos médios verificados com a amostra em estudo variaram entre $10^{5,0}$ e $10^{6,0}$. Nas culturas jovens,

60-80% de confluência, o ECP não só é mais rápido e característico como os títulos também são mais elevados.

Nas culturas infectadas, fixadas pelo Bouin e coradas pela hematoxilina-eosina, observaram-se grandes sincícios, nos quais muitos dos núcleos continham inclusão do tipo A de Cowdry (34), circundadas por um halo claro, distinto, que as separava da cromatina marginada.

Nas culturas de origem bovina não só ocorreu ECP característico como os títulos foram equivalentes aos observados em RFB. Todavia, nas linhagens celulares derivadas de rim de macaco e de suíno não houve ECP, nem evidência de multiplicação do vírus.

Formação de placas — As garrafas que receberam o vírus diluído a 10^{-1} e 10^{-2} revelaram placas confluentes, enquanto que, nas diluições mais elevadas, 10^{-3} e 10^{-4} , as placas eram isoladas, com bordos irregulares, medindo 1-3mm de diâmetro.

Hemaglutinação e hemadsorção — Pelos métodos empregados, o vírus não mostrou atividade hemaglutinante, nem hemadsorvente, independentemente das temperaturas e períodos de incubação.

Características físico-químicas — A Tabela 1 revela que se trata de vírus lável ao éter etílico, clorofórmio, ao pH 3,0 e aquecimento por 30min a 50°C. O IDUR inibiu o ECP do vírus, embora não o tivesse anulado de todo. Nas culturas infectadas e mantidas em meio nutritivo, sem o inibidor, a degeneração celular atingiu sua plenitude no quarto dia, após a inoculação, ao passo que ocorreram pequenas áreas de ECP não progressivas em um dos tubos cujo meio continha IDUR. As titulações comparativas demonstraram que o composto exerceu efeito depressor significativo, sugerindo que o vírus é tipo ADN. Resultado semelhante foi verificado com o vírus da PR. O IDUR não influiu no ECP, nem no rendimento da amostra PAIN — enterovírus bovino — um vírus ARN. Não foram notadas anormalidades nas culturas que receberam somente o meio nutritivo com a droga.

Tabela 1

Sensibilidade da amostra Sta. 0/700 a certos tratamentos físico-químico

Tratamentos	Vírus *							
	Sta. 0/700		Pseudo-raiva		Pain (ECBO)		Aftosa "A"	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Éter 20%	0**	4,50			7,50	7,50		
Clorofórmio 5%	0	4,50	<1,00	4,50			6,00	6,00
pH 3,0	<1,00	5,00	<1,00	5,50	8,00	8,00		
IDUR 35 µg/ml	1,00	6,00	1,50	5,50	8,00	8,00		
Aquecido 50° C 30 min	<1,00	4,50						

* Título em log. neg. DICT₅₀; a: tratado; b: não tratado; ** vírus não diluído; IDUR: 5-iodo-2' desoxiuridina.

Animais de experimentação — (a) *Cobaios*. Foram utilizados cobaios adultos, machos e fêmeas grávidas, aos quais se aplicou o vírus pelas vias ID e IDP. No segundo dia após a inoculação ID, certa reação inflamatória já era evidente: a epiderme tornou-se espessa e ligeiramente eritematosa. Nos dias subsequentes, o processo evoluiu em intensidade, atingindo 2 a 3cm de diâmetro, estabelecendo-se, ainda, áreas de alopecia na região inflamada, que persistiram por mais de 3 semanas. A inoculação IDP ocasionou congestão e edema na região inoculada. Com a evolução do processo, os animais reagiram a estímulos dolorosos na pata inoculada. Estabeleceu-se, ainda, um anel escuro em torno do coxim plantar e, finalmente, desprendimento da epiderme, sem que houvesse formação de vesículas. O edema, por vezes, estendeu-se por todo o membro correspondente à pata inoculada. Em alguns animais, estabeleceu-se apreciável aumento dos testículos e úlceras que, no saco escrotal, se cobriram de crostas e cicatrizaram-se lentamente. Nas fêmeas grávidas não houve abortamentos. (b) *Coelhos*. Nos animais inoculados pela via ID, as reações foram parecidas com as dos cobaios, porém menos pronunciadas. Os animais injetados por via IV não revelaram anormalidades. (c) *Camundongos*. Animais lactentes de 0-1 dia de idade adoeceram e morreram entre 3 e 5 dias depois de inoculados. Independentemente da via de aplicação do vírus, a exteriorização da doença foi a mesma e se caracterizou pelo aparecimento de áreas eritematosas disseminadas pelo corpo, sendo mais pronunciadas e edematosas nas narinas. Manchas semelhantes ocorreram nos dedos, pernas e cauda. Entretanto, tentativas para perpetuar o vírus em camundongos não tiveram sucesso. À medida que se sucediam as passagens, não só aumentava o período de incubação e de duração da doença, como diminuía a mortalidade. Nestas experiências, foram utilizadas emulsões de cérebro, carcaça ou pele, na proporção de 10% em solução salina tamponada, adicionada de antibióticos. Os camundongos adultos infectados com o material de cultivo em RFB não apresentaram perturbações que pudessem ser incriminadas ao vírus. (d) *Embrião de galinha*. Não ocorreram mortes em consequência da infecção pelo vírus, assim como não foi possível evidenciar lesões nas membranas embrionárias ou no próprio embrião. As culturas de RFB, inoculadas com as preparações dos líquidos embrionários ou com o extrato dos embriões, também não revelaram a presença do vírus.

Identificação do vírus — (a) *Provas de neutralização*. Pela leitura da Tabela 2, verifica-se que os soros imunes contra o vírus da RIB e PR, cujos títulos foram 1:518 e 1:128, respectivamente, não neutralizaram a estirpe Sta. 0/700. Por outro lado, o soro anti-Sta. 0/700 neutralizou completamente o vírus homólogo e o da MHB. No teste inverso, o soro anti-MHB neutralizou ambos os vírus: o homólogo e a estirpe em estudos. (b) *Provas de imunidade cruzada*. Os resultados das provas de imunidade

acham-se reunidos na Tabela 3. Vê-se que houve proteção recíproca entre as duas estirpes de vírus. Nos cobaios imunes, com um ou com o outro vírus, não foram notadas perturbações no local da aplicação do vírus, enquanto que, nos normais, desenvolveram-se lesões características.

Tabela 2

Comparação sorológica com a amostra Sta. 0/700

Soros imunes** 1:10	Título do vírus*		IN _{50%}
	Sta. 0/700	MHB	
RIB	5,50		< 1,00
pseudo-raiva	6,00		< 1,00
Sta. 0/700	< 1,00		> 4,50
Sta. 0/700		< 1,00	> 5,00
MHB	< 1,00		> 5,50
MHB		< 1,00	> 4,00
Soros controles			
Coelho	5,50		
Frango	6,00		
Cobaio	5,50	6,00	
Cobaio	6,50	5,00	

* Título em log. neg. DICT₅₀

** diluição final do soro

IN: índice neutralizante log. 10

RIB: rinotraqueite infecciosa bovina

MHB: mamilite herpética bovina

Tabela 3

Provas de imunidade cruzada em cobaios
com os vírus Sta. 0/700 e MHB

Cobaios imunes	Vírus*	
	Sta. 0/700	MHB
Sta. 0/700	0/2	0/6
MHB	0/5	0/2
Controles normais	2/2	2/2

* Inoculação ID, 0,2 ml

MHB: mamilite herpética bovina

O numerador indica o número de animais que adoeceram com lesões locais; o denominador, o número de inoculados

Discussão

O agente viral estudado mostrou qualidades parecidas com as do vírus da MHB. Nas culturas de RFB, o ECP se caracterizou pela formação de grandes sincícios com numerosos núcleos, muitos dos quais continham corpúsculo eosinofílico do tipo A. O vírus revelou-se lável ao éter etílico, clorofórmio, pH 3,0 e ao aquecimento por 30 min a 50°C, assim como o IDUR exerceu particular influência inibidora sobre o título infectante do vírus. Em outros

experimentos, relativos à caracterização de certos agentes virais e nos quais foi utilizada a estirpe Sta. 0/700, como controle das provas de inibição pelo IDUR, verificou-se que a timidina, na concentração de 40 µg/ml, teve efeito reverso nas culturas tratadas com IDUR.

A infecção experimental, em cobaios, coelhos e camundongos neonatos, ocasionou manifestações patológicas semelhantes às descritas por outros pesquisadores que se ocuparam no estudo do vírus da MHB (3, 20, 22, 28). O vírus não proliferou ou produziu lesões em embrião de galinha, assim como não aglutinou e nem adsorveu eritrócitos de cobaio, coelho, carneiro, galinha e de origem humana (3, 20). Além dessas analogias com o vírus da MHB, as provas de neutralização e de imunidade evidenciaram claramente que as estirpes Sta. 0/700 e a TVA da MHB são idênticas ou sorológico e imunologicamente relacionadas.

A MHB é uma enfermidade vesicular que afeta a pele das tetas e do úbere de vacas em lactação e novilhas recém-paridas. Frequentemente, os animais jovens, que mamam em vacas afetadas, apresentam lesões na face, focinho e mucosa bucal. Nos animais adultos, as lesões, por vezes, assumem aspecto mais grave como a gangrena da pele do úbere (6, 25); também foram notadas ulcerações na boca de vacas, concomitantemente, com lesões nas tetas e úbere (5). A MHB, usualmente, acomete o gado leiteiro. Entretanto, Deas & Johnston (5) tiveram oportunidade de investigar um surto de mamilite em animais de corte. Constataram que, nos bezerros do plantel, além das lesões no focinho e face, um animal apresentou úlcera sublingual, tendo sido recuperado o vírus do tecido ulcerado. Castrucci & col. (3) estudaram uma estirpe de vírus de MHB que haviam isolado do tecido ulcerado da gengiva de um bezerro. O animal morreu em decorrência de distúrbios do trato intestinal e no exame *post-mortem* foi encontrada apenas a lesão gengival.

Experimentalmente, a aplicação do vírus nas tetas e úbere reproduz a doença (5, 19, 22). A inoculação do vírus por via IV em bovinos resulta na formação de nódulos generalizados (3, 12, 28), enquanto que, por via ID, as reações se circunscrevem à área inoculada. Povey & James (23) aplicaram o vírus por via ID nas tetas de uma novilha, logo após o parto, verificando o aparecimento de erupções vesiculares nos mamilos e úbere e, ainda, vulvo-vaginite, tendo recuperado o vírus da úlcera vulvo-vaginal.

Nos estudos relativos à caracterização do vírus da MHB, Martin & col. (20) verificaram que o referido agente era cultural e sorologicamente indistinguível do Allerton — vírus incluído no grupo herpético (17). Este vírus é o protótipo do Grupo II dos agentes virais associados

à dermatite nodular (lumpy skin disease) que foram estudados por Alexander & col. (1). A dermatite nodular caracteriza-se, principalmente, pelo desenvolvimento de formações nodulares generalizadas na pele de bovinos. Entretanto, Huygelen (14) e Huygelen & col. (15), na Rua-anda-Urandi, isolaram o vírus Allerton de bovinos que apresentavam erosões e úlceras nas tetas e úbere, tendo constatado ulcerações na boca de bezerros lactentes. Na Tanzânia, Schiemann & col. (31) obtiveram o mesmo vírus das lesões da língua e do gânglio prescapular de búfalos (*S. caffer*).

É interessante assinalar que, além dos estudos de Martin & col. (20), as estirpes isoladas de bovinos nos EUA (35, 36), na Itália (3) e de búfalos na Tanzânia (31) foram neutralizadas pelos soros anti-MHB e anti-Allerton, embora os vírus tivessem origem distinta, tanto de uma quanto de outra afecção. Recentemente, Dardiri (4), considerando as analogias entre as características dos dois vírus, sugeriu fossem eles incluídos em um único grupo, denominado herpesvírus dermopático bovino.

No que concerne ao Brasil, é possível que a MHB tenha passado despercebida ou confundida com outras enfermidades, como a varíola bovina. As erupções vesiculares e as ulcerações nas tetas, úbere e a vulvo-vaginite, bem como as erosões na boca, se prestariam à confusão com a própria febre aftosa, embora a última apresente características que a distinguem da MHB. Certas condições nodulares da pele, usualmente consideradas de origem parasitária ou bacteriana, poderiam simular a dermatite nodular. É possível, por fim, que as deficiências de recursos laboratoriais influissem no sentido de que o vírus não tivesse sido comprovado há mais tempo. A amostra em estudo foi isolada no curso de um surto característico de MHB, tendo sido verificadas lesões no focinho de bezerros do plantel. Na região onde ocorreu a doença, anteriormente vinham sendo observadas idênticas manifestações patológicas no gado leiteiro com acentuado prejuízo para sua produção.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. João Araújo Almeida, Três Rios, RJ, pela coleta e remessa do material que propiciou o isolamento do vírus. Ao Dr. R. C. Povey, Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Bristol, Inglaterra, pela gentileza em remeter a estirpe TVA da MHB. Ao Dr. Renato Augusto da Silva, IPEACS, Rio de Janeiro, RJ, pelo obséquio de fornecer amostra do vírus da pseudo-raiva e ao Dr. Moacyr R. Nilsson, Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, SP, pelo favor de nos ceder a desoxiuridina.

Referências Bibliográficas

1. ALEXANDER, R. A.; PLOWRIGHT, W. & HAIG, D. A. — Cytopathogenic agents associated with lumpy-skin disease of cattle. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 5:489-492, 1957.
2. ANDREWES, C. & HORSTMANN, D. M. — The susceptibility of viruses to ethyl ether. *J. gen. Microbiol.*, 3:290-297, 1949.
3. CASTRUCCI, G.; PEDINI, B.; CILLI, V. & ARANCIA, G. — Characterisation of a viral agent resembling bovine herpes mammillitis virus. *Vet. Rec.*, 90:325-335, 1972.
4. DARDIRI, A. H. — Comments on bovine mammillitis. *J. Am. vet. med. Assoc.*, 163:917-918, 1973.
5. DEAS, D. W. & JOHNSTON, W. S. — An outbreak of an ulcerative skin condition of the udder and teats of dairy cattle in the east of Scotland. *Vet. Rec.*, 78:828-829, 1966.
6. DERBYSHIRE, J. B. & HAIG, D. A. — Isolation of bovine mammillitis virus from skin gangrene of the bovine udder. *Vet. Rec.*, 85:389-390, 1969.
7. DILOVSKI, M.; TEKERLOKOV, P. & HADJIEV, G. — Ustanovavane virusa na herpesnja mamilit. Veterinarnomed. Nauki, Bulgaria, 11:60-65, 1974. In: *Vet. Bull.*, 44:788, 1974. Abst. 5941.
8. FELDMAN, H.A. & WANG, S.S. — Sensitivity of various viruses to chloroform. *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.*, 106:736-738, 1961.
9. GIBBS, E. P. J.; VOYLE, C. A. & MADELEY, C. R. — An examination of certain features of the fine structure of bovine herpes mammillitis virus by negative staining. *Res. vet. Sci.*, 12:585-586, 1971.
10. GIBBS, E. P. J. & COLLINGS, D. F. — Observations on bovine herpes mammillitis (BHM) virus infections of heavily pregnant heifers and young calves. *Vet. Rec.*, 90:66-68, 1972.
11. GIBBS, E. P. J.; JOHNSON, R. H. & OSBORNE, A. D. — Field observations on the epidemiology of bovine herpes mammillitis. *Vet. Rec.*, 91:395-401, 1972.
12. HAIG, D. A. — Production of generalised skin lesions in calves inoculated with bovine mammillitis virus. *Vet. Rec.*, 80:311-312, 1967.
13. HERRMANN, E. C. Jr. — Plaque inhibition test for detection of specific inhibitors of DNA containing viruses. *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.*, 107:142-145, 1961.
14. HUYGELEN, C. — Allerton virus, a cytopathogenic agent associated with lumpy skin disease. I. Propagation in tissue cultures of bovine and ovine testis cells. *Zbl. Vet. Med.*, 7:664-670, 1960.
15. HUYGELEN, C.; THIENPONT, D.; DEKEYSER, P. J. & VANDERVELDEN, M. — Allerton virus, a cytopathogenic agent associated with lumpy skin disease. II. Inoculation of animals with tissue culture passaged virus. *Zbl. Vet. Med.*, 7:754-760, 1960.
16. JOHNSTON, W. S.; WRAY, C. & SCOTT, J. A. — An outbreak of bovine herpes mammillitis in a suckler herd. *Vet. Rec.*, 88:372, 1971.
17. KIPPS, A. & POLSON, A. — Allerton virus: a probable new member of the herpesvirus group. *S. Afr. med. J.*, 40:127, 1966.
18. MARTIN, W. B.; MARTIN, B. & LAUDER, I. M. — Ulcerations of cow's teats caused by a virus. *Vet. Rec.*, 76:15-16, 1964.
19. MARTIN, W. B.; MARTIN, B.; HAY, D. & LAUDER, I. M. — Bovine ulcerative mammillitis caused by a herpesvirus. *Vet. Rec.*, 78:494-497, 1966.
20. MARTIN, W. B.; HAY, D.; CRAWFORD, L. V.; LE BOUVIER, G. L. & CRAWFORD, E. M. — Characteristics of bovine mammillitis virus. *J. gen. Microbiol.*, 45:325-332, 1966.
21. MARTIN, W. B.; JAMES, Z. H.; LAUDER, I. M.; MURRAY, M. & PIRIE, H. M. — Pathogenesis of bovine mammillitis virus infection in cattle. *Am. J. vet. Res.*, 30:2151-2166, 1969.
22. PEPPER, T. A.; STAFFORD, L. P.; JOHNSON, R. H. & OSBORNE, A. D. — Bovine ulcerative mammillitis caused by a herpesvirus. *Vet. Rec.*, 78:569, 1966.
23. POVEY, R. C. & JAMES, Z. H. — Bovine herpes mammillitis virus and vulvo-vaginitis. *Vet. Rec.*, 92:231-233, 1973.
24. REED, L. J. & MUENCH, J. A. — A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27:493-497, 1938.
25. RWEYEMAMU, M. M.; JOHNSON, R. H. & TUTT, J. B. — Some observations on herpes virus mammillitis of bovine animals. *Vet. Rec.*, 79:810-811, 1966.
26. RWEYEMAMU, M. M. & JOHNSON, R. H. — Bovine herpes mammillitis virus. Part I: In-vitro behaviour of the virus. *Br. vet. J.*, 123:482-491, 1967.
27. RWEYEMAMU, M. M. & JOHNSON, R. H. — Bovine herpes mammillitis virus, Part II: Standardization of an in-vitro serum neutralization test. *Br. vet. J.*, 124:9-15, 1968.
28. RWEYEMAMU, M. M.; JOHNSON, R. H. & McCREA, M. R. — Bovine herpes mammillitis. III: Observations on experimental infection. *Br. vet. J.*, 124:317-324, 1968.
29. RWEYEMAMU, M. M.; JOHNSON, R. H. & LAURILLARD, R. E. — Serological findings in bovine herpes mammillitis. *Br. vet. J.*, 125:317-325, 1969.
30. SALK, J. E. — A simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza-virus and the corresponding antibody. *J. Immunol.*, 49:87-98, 1944.
31. SCHIEMANN, B.; PLOWRIGHT, W. & JESSET, D. M. — Allerton-type herpes virus as a cause of lesions of the alimentary tract in a severe disease of Tanzanian buffaloes (*Synerus caffer*). *Vet. Rec.*, 89:17-22, 1971.
32. 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. & Med.*, 97:802-809, 1958.
33. TURNER, A. J.; KOVESDY, L.; CIANTER, M. S.; NICHOLS, W. A. & CHATAN, R. O. — Isolation of bovine mammillitis virus from dairy cattle in Victoria: *Aust. vet. J.*, 50:578-579, 1974.
34. VAN ROOYEN, C. E. & RHODES, A. J. — Virus disease of man. Oxford Medical Publications. Londres. Oxford University Press, 1940.
35. WEAVER, L. D.; DELLERS, R. W. & DARDIRI, A. H. — Bovine herpes mammillitis in New York. *J. Am. vet. med. Assoc.*, 160:1643-1644, 1972.
36. YEDLOUTSCHNIG, R. J.; BREESE, S. S. Jr.; HESS, W. R.; DARDIRI, A. H.; TAYLOR, W. D.; BARNE, D. M.; PAGE, R. W. & RUEBKE, H. J. — Bovine herpes mammillitis-like disease diagnosed in the United States. Proc. 74th. Ann. Meeting. U. S. Anim. Health Assoc., 1970. 208-212, 1971.

Efficacy of some simple methods for long-term preservation of bacterial cultures*

I. Suassuna, Ivone R. Suassuna, I.D. Ricciardi & L.C.D. Formiga

Summary

Simple nutrient media were evaluated for preserving Gram-negative bacterial cultures without periodic transfer. The three methods employed were: a) nutrient agar stabs and streaks with short slopes in corked tubes sealed with paraffin-wax; b) half filled flame-sealed ampoules containing semi-solid nutrient agar stabs; c) full flame-sealed small ampoules containing nutrient broth cultures. Some cultures were observed for up to seven years. Loss of viability varied with method of preservation and bacterial genera. Preliminary data on the use of Cary and Blair transportation medium for maintenance of plague bacilli and glycerolated buffered saline for a few other genera, including *Acinetobacter* and *Corynebacterium* are also presented.

Resumo

Eficiência de métodos simples para conservação a longo prazo de culturas bacterianas

Foi realizada uma avaliação de meios nutritivos simples, para manutenção de culturas de bactérias Gram-negativas, sem serem periodicamente repicadas. Os métodos utilizados correspondem a: a) tubos com agar simples, ligeiramente inclinados, tapados com rolhas de cortiça parafinada; b) ampolas grandes, fechadas a fogo, cheias até a metade, com agar simples semi-sólido e c) pequenas ampolas fechadas na chama, após completamente cheias com cultura em caldo simples. Em cada caso, para algumas culturas, um período de sobrevivência de até sete anos pode ser observado. A perda de viabilidade variou de acordo com o método de conservação e com os gêneros bacterianos considerados. Dados preliminares, sobre o uso do meio de transporte de Cary & Blair e de solução salina tamponada e glicerinada, para alguns outros gêneros bacterianos de mais difícil conservação, incluindo *Acinetobacter* e *Corynebacterium*, são também apresentados.

Introduction

Some processes of preservation of bacteria such as lyophilisation and frozen state storage at very low temperatures have gained wide acceptance both on theoretical and practical grounds(5). On the other hand maintenance of bacteria in nutrient media was perhaps the first method used, and it is still widely used in small laboratories and among bacteriologists in places in which more complex facilities are not available. A number of variants exists, from periodic transfer in solid or liquid media, to extended maintenance in media covered with oil, or in ampoules with fluids from animal origin (8).

We have observed in a few laboratories the long term storage of type cultures, or of newly isolated strains of *Enterobacteriaceae*, and some other Gram negative aerobic rods, in simple nutrient agar slants in tight-stopper

red tubes, or in nutrient broth in flame-sealed ampoules, without periodic transfer.

As related to nutrient media for preservation of bacteria, in his review, Martin(5) only quotes conservation by periodic transfer. We were unable to find reference in the literature to preserving bacteria under paraffin-oil, a method usually applied to fungi, which may work equally well for bacteria.

The present report deals with an evaluation of nutrient media for keeping Gram negative facultative bacteria under long term preservation, as practiced in many entrobacteriaceae laboratories in countries throughout the world. Some preliminary observations are made on a few other bacterial genera that we felt too sensitive to be preserved in simple nutrient media.

* Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia, UFRJ, 20000 Rio de Janeiro RJ.

Material and Methods

Source of strains — Most strains were obtained from clinical specimens, and according to their importance were identified to the level of genus, species or roughly classified as coliforms, paracolon, proteus or non-enteric Gram-negative organisms. For the sake of comparison type strains obtained from international collections of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* were also included.

Maintenance media — Simple nutrient broth, composed of Bactopeptone, 1%; sodium chloride, 0.5%; meat extract, 0.3%; pH 7.0-7.2; was the basic medium, which was used, sometimes made semi-solid by adding 0.4% Bacto agar, or solidified by using 1.5% agar.

Broth cultures after over-night incubation were dispensed with Pasteur pipettes into small 2 ml ampoules to halfway up their neck. These ampoules were then sealed in a Bunsen flame. The semi-solid nutrient agar was dispensed in larger 5 ml ampoules with flat bottoms, and inoculation done by stabbing. Solid nutrient agar was distributed in 100 × 13 mm culture tubes, and allowed to solidify with short slopes. These were stabbed and streaked when inoculated. After over-night incubation, corks sealed with paraffin wax were substituted for the cotton wool plugs (Fig. 1).

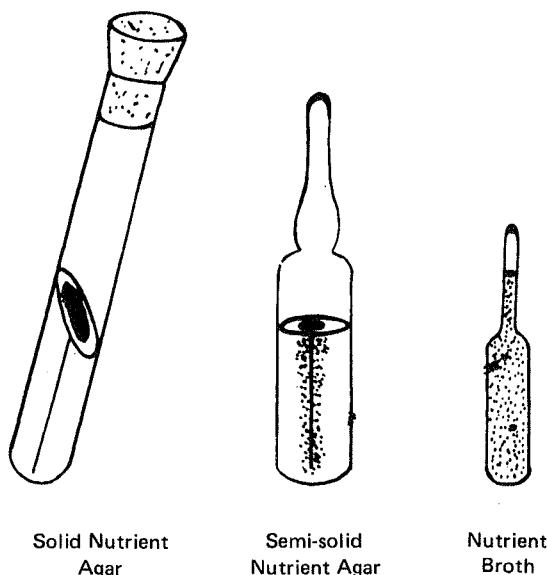


Fig. 1 — Maintenance media for keeping cultures.

A saline solution plus glycerol was prepared by incorporating 15% neutral glycerol in 0.9% sodium chloride solution., pH (7.2-7.4) ws checked and corrected potentiometrically. A previous report of this solution has bee made by Formiga, Suassuna & Silveira(3).

Cary & Blair medium(2) was prepared and used as described by these authors.

Results and Discussion

Table 1 presents the results observed with 582 strains in solid nutrient agar. Generally 6 to 12% of preserved strains are lost regardless of the lenght of preservation, with 10.5% being the overall loss. In two experiments, namely after three years six months, and after five years six months, heavy losses were observed. This could not be explained by variations in the nature of the bacterial strains included, but was probably due to minor variations in batches of media. Thus a carefull control of variables in the media is essential.

Table 1

Conservation of Enterobacteriaceae and other Gram-negative aerobic rods in solid nutrient agar

Length of observation	Number of strains	Loss of viability	
		Number	Per cent
1 year	7	1	—
1 year 6 months	5	0	—
2 year	29	0	—
2 year 6 months	7	2	—
3 year	7	3	—
3 year 6 months	13	9	69.2
4 year	25	3	12.0
4 year 6 months	26	3	11.5
5 year	12	0	—
5 year 6 months	17	7	41.2
6 year	83	6	7.2
6 year 6 months	140	12	8.6
7 year	88	5	5.7
7 year 6 months	22	2	9.1
8 year	52	3	5.8
8 year 6 months	41	5	12.2
9 year or more	8	0	—
Total	582	61	10.5

The overall losses using half-filled ampoules with semi-solid nutrient agar were slightly heavier, reaching 11.9% (Table 2). Taking into account the possible influence of batch variation in experiments four years old and longer, heavier losses might be expected after this time than for shorter periods, an average loss of viability ranging from 2-8%. This average loss compares favourably with the solid nutrient agar, for the periods shorter than four years. The nature of the bacterial strains kept under storage is important, as will be shown later.

The overall losses with nutrient broth were the highest reaching 17.6% for the observed period, with an average loss of close to 12% even before five years, and heavier losses after longer periods (Table 3). Once again the type of bacteria was important as it will be later appreciated.

Table 2

Conservation of Enterobacteriaceae and other Gram-negative aerobic rods in semi-solid nutrient agar

Length of observation	Number of strains	Loss of viability	
		Number	Per cent
1 year	64	3	4.7
1 year 6 months	39	3	7.7
2 year	39	3	7.7
2 year 6 months	39	2	5.1
3 year	34	2	5.9
3 year 6 months	92	2	2.2
4 year	32	6	18.7
4 year 6 months	30	5	16.7
5 year	23	2	8.7
5 year 6 months	7	3	—
6 year	62	21	33.9
6 year 6 months	13	5	38.5
8 year or more	6	0	—
Total	480	57	11.9

Table 3

Conservation of Enterobacteriaceae and other Gram-negative aerobic rods in nutrient broth

(Length of) observation	Number of strains	Loss of viability	
		Number	Per cent
1 year 6 months	2	1	—
2 year	6	1	—
2 year 6 months	9	0	—
3 year	42	1	2.4
3 year 6 months	25	3	12.0
4 year	53	6	11.3
4 year 6 months	56	7	12.5
5 year	68	19	27.9
5 year 6 months	51	13	25.7
6 year	16	7	43.7
6 year 6 months	5	1	—
7 year	2	0	—
Total	335	59	17.6

Table 4 shows failures in the routine preservation of the bacterial strains by the methods already mentioned. Although the figure for overall loss was the lowest for nutrient agar, the contamination rate was considerably higher than either of the other two media, probably due to more handling after inoculation and to the nature of the seal (paraffin waxed cork). Air-borne fungi predominated and there were a few spore-bearing bacilli. Contrary to what might be expected, dessication due to incomplete sealing was observed the least, probably because the agar tended to hold moisture. In contrast, incomplete sealing and leaking was more frequent with nutrient broth kept in ampoules. This Table also shows that careful control of conditions of sealing could prevent a number of losses during storage, particularly with the solid nutrient agar, which might otherwise be sealed with screw caps, aluminium foil or perhaps utilize flame-sealed ampoules, etc.

The way various groups of bacteria survived storage is summarized in Table 5. For some genera and/or species, like *Salmonella*, *Citrobacter*, the four *Proteus* species and *Providencia*, fairly good survival was obtained regardless of method. For others, like *Escherichia*, including *Alkalescens-Dispar* organisms and the related *Shigella* species (mainly *S. flexneri* and *S. sonnei*), there was an ascending gradient of losses from nutrient agar, through semi-solid agar, to nutrient broth. In contrast, the observations with the more aerobic *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups were against the general trend since they showed greater losses in semi-solid nutrient agar. It may be observed that *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella* and *Enterobacter* organisms did not show such large losses (e.g., 2.1% for *Klebsiella-Enterobacter*, 8.3% for *Escherichia* and *Shigella*) as compared with 27.6% for *Pseudomonas* and *Achromobacter*.

During these observations it was soon found that the above methods were not satisfactory, even for very short periods of time, for such bacterial-groups as the Gram-negative *Mimeae* (*Acinetobacter*) and the Gram-positive coryneform bacteria. Glycerol as a protection against

Table 4
Losses of Enterobacteriaceae and other Gram-negative in nutrient media as related to the type of failure observed

Conservation	Strains lost (Nº)	Failures					
		Nº	Loss of viability %	Presence of contaminants		Incomplete sealing %	
				Nº	%	Nº	%
Solid nutrient agar (tubes)	62	37	(59.7)	24	(38.7)	1	(1.6)
Semi-solid Nutrient agar (ampoules)	70	64	(91.4)	3	(4.3)	3	(4.3)
Nutrient broth (ampoules)	65	57	(87.7)	3	(4.6)	5	(7.7)
Total	197	158	(80.2)	30	(15.2)	9	(4.6)

Table 5

Losses of viability during conservation in nutrient media as related with bacterial groups of Enterobacteriaceae and other Gram-negative rods

Bacterial group	Solid nutrient agar			Semi-solid nutrient agar			Nutrient broth		
	Length of observation (years)	Number of strains	Losses n°(%)	Length of observation (years)	Number of strains	Losses n°(%)	Length of observation (years)	Number of strains	Losses n°(%)
Shigella-escherichia	1 - 8	87	1(1.1)	1 - 6 ^{1/2}	48	4(8.3)	2 - 8	48	11(22.9)
Salmonella-citrobacter	3 ^{1/2} - 8	26	1(3.8)	1 ^{1/2} - 6 ^{1/2}	22	0(-)	4 - 7	24	1(4.2)
Proteus-providencia	2 - 8	21	0(-)	1 - 6	66	2(3.0)	1 ^{1/2} - 6 ^{1/2}	57	2(3.5)
Klebsiella-enterobacter	3 - 7	5	0(-)	1 - 6 ^{1/2}	47	1(2.1)	4 ^{1/2} - 5	3	0(-)
Pseudomonas-achromobacter	2 ^{1/2}	2	0(-)	2 - 6 ^{1/2}	87	24(27.6)	2 - 5	24	1(4.2)

low temperatures was used and was incorporated in plain isotonic saline solution. This method is being extended by some of our associates to a number of other bacterial groups, and even yeasts, by using domestic electric refrigerators or deep-freezers for storage. The preliminary data are shown in Table 6. Results are promising with diphtheroid organisms kept for one year at 10°C and for *Acinetobacter* stored for up to three years. Observations were also made on the pathogenic *Neisseria* strains, thus extending the results obtained with glycerol in nutrient media, as reported by Howard(4).

It was a chance observation, in accordance with some other reports in the literature (6,7) that plague bacilli obtained directly from bubonic lesions could survive for very long periods in the transport medium of Cary & Blair (1964), as shown in Table 7. In most cases, those were mixed cultures sometimes heavily contaminated. From 13 specimens which gave plague bacilli at the first examination, five produced the same organisms after one year two months storage in Cary & Blair media in screw-capped culture tubes. From these five positives, two were available three years six months after inoculation with the clinical specimen, and they still proved positive for *Yersinia pestis*. These preliminary observations point out the possibility of other transport media(9) which include reducing mechanisms to prevent the destructive action of oxygen, being used instead of Cary & Blair's medium.

Finally, we are aware we have been discussing results from the point of view of survival only. We cannot comment on the preservation or specific characteristics of the stored microorganisms, as they were mostly wild strains not studied completely. It is worthy of mention, however, that serological identification of some strains of *Pseudomonas* was readily attained, preserved by the discussed methods, some 17 years after isolation(10).

Table 6

Conservation of bacteria in fifteen per cent glycerolated and neutralized saline solution (*)

Bacterial group	Number of strains	Temperature of storage	Viables	
			Number	Length of time
"Diphtheroids"	17	-10°C	14	1 year
	24	"	9	3 year
Diphtheric bacilli	8	"	6	1 year
	16	"	3	3 year
Mimae	5	"	5	3 year
Gonococcus	1	-30°C	1	3 months
Meningococcus	1	"	1	6 months

(*) Formiga, Suassuna & Silveira (1973)

Table 7

Extended recovery of plague bacilli from bubonic specimens kept in Cary & Blair transport medium*

Number of specimens	Number recovered	Length of time
13	5	1 y. 2 mo.-1 y. 6 mo.
2	2	3 y. 6 mo.

* Ricciardi & col. (7)

References

1. BENEDICT, R.G.; SHARPE, E.S.; CORMAN, J.; MEYERS, G.B.; BAER, E.F.; HALL, H.H. & JACKSON, R.W. — Preservation of microrganisms by freezedrying. II. The destructive action of oxygen. Additional stabilizers for *Serratia marcescens*. Experiments with other microorganisms. *Appl. Microbiol.*, 9:256-262, 1961.
2. CARY, S.G. & BLAIR, E.B. — New transport medium for shipment of clinical specimens, I. Fecal specimens. *J. Bacteriol.*, 88:96-98, 1964.
3. FORMIGA, L.C.D.; SUASSUNA, I. & SILVEIRA, M.H. da — Conservação de bactérias em solução salina glicerinada em baixas temperaturas. *Cienc. & Cult.*, 24 (Supl.):296, 1972.
4. HOWARD, D.H. — The preservation of bacteria by freezing in glycerol broth. *J. Bacteriol.*, 71:625, 1956.
5. MARTIN, S.M. — Conservation of microrganisms. *Ann. Rev. Microbiol.*, 18:1-17, 1964.
6. MELLO, M.T. de; PARAÇAMPO, H. & SANTOS, D. dos A. — Medio de Cary & Blair para la conservacion y el transporte de material sospechoso de peste, en zonas rurales. *Rev. Lat. - Amer. Microbiol.*, 12:67-71, 1970.
7. RICCIARDI, I.D.; NUNES, M.P.; REIS, L.A. & SUASSUNA, I. — Viabilidade de *Pasteurella pestis* em espécimes conservados no meio de Cary & Blair. *Rev. Microbiol.*, 3:7-10, 1972.
8. SOLE-VERNIN, C. — Preservação de culturas microbianas por processos simples, com especial referência aos estreptococos. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 3:1-8, 1961.
9. STUART, R.D.; TOSACH, S.R. & PATSULA, T.M. — The problem of transport of specimens for culture of gonococci. *Canad. J. Publ. Hlth.*, 45:73-83, 1954.
10. SUASSUNA, I.; SUASSUNA, I.R. & TIBANA, A. — Associação de *Pseudomonas aeruginosa* com diarréia aguda em adultos. *Ciênc. & Cult.*, 25 (Supl.):446, 1973.

Ocorrência de esporocistos de *Sarcocystis* sp. em cães na cidade de São Paulo*

Saemi Ogassawara**, Carlos Eduardo Larsson***, Maria Helena M.A. Larsson***,
Mitika K. Hagiwara*** & Guacira Gouveia****

Resumo

Através da técnica de centrifugação em água-éter, foi detectada a presença de esporocistos de *Sarcocystis* sp. em 5,8% (9 amostras) de 155 amostras de fezes de cães de idade, raça e sexo diferentes, procedentes de diversas regiões da cidade de São Paulo. Inoculações experimentais, em quatro cães fêmeas com esporocistos não deram resultados positivos da infecção, nos 20 dias sucessivos, durante os quais foram feitas análises de fezes diariamente.

Summary

Incidence of sporocysts of Sarcocystis sp. in dog of the city of São Paulo

One hundred and fifty five fecal samples from dogs from different areas of the city of São Paulo, of distinct ages, races and sexes, yielded nine (5,8%) positive samples for the presence of sporocysts of *Sarcocystis* sp. The ether-water centrifugation method was employed. Experimental infection using sporocysts in four female dogs did not yield positive results of infection. Daily examinations of their feces were performed during a 20 days period.

Introdução

A participação de cães e gatos e do próprio homem, na transmissão de *Sarcocystis* spp. tem sido demonstrada experimentalmente, através da administração de cistos coletados de diferentes músculos de bovinos, suínos e ovinos e a subsequente detecção de esporocistos nas fezes dos hospedeiros (6, 14, 15).

Mahrt(10), em condições naturais, detectou esporocistos nas fezes de cães Beagle, procedentes de uma fonte comercial, onde se forneciam vísceras cruas de bovinos.

Fayer & Johnson(2) conseguiram infectar bezerros e produzir doença de caráter agudo, pela administração oral de esporocistos de *Sarcocystis fusiformis*, provenientes de fezes de cães.

Além dos estudos mencionados, outros autores se envolveram com o problema(12, 16, 19). O presente trabalho representa as observações de exames parasitológicos de cães, com o propósito de contribuir para a elucidação do ciclo evolutivo em *Sarcocystis* sp..

Material e Métodos

Foram examinadas 155 amostras de fezes de cães de raças, idades e sexos diferentes, procedentes de diversas regiões na cidade de São Paulo, entre agosto de 1973 e julho de 1974, com o emprego da técnica de centrifugação em água-éter, de acordo com Ferreira & col.(3). As amostras que deram resultados positivos para esporocistos foram diluídas em bicromato de potássio a 2% e conservadas em refrigerador. Com o uso de ocular micrométrica Leitz Wetzlar, foram calculados os tamanhos máximo, mínimo e médio de 100 esporocistos.

Seis cães sem raça definida, de aproximadamente um ano de idade e do sexo feminino, foram utilizados para infecção experimental. Desde sua chegada ao laboratório, passaram a ser alimentados com ração granulada Kelkuts. A ausência de infecção anterior à experimentação foi verificada pelo confinamento dos animais em isolamento e exames periódicos das fezes. O número de esporocistos (inóculo) foi calculado com o emprego da

* Trabalho apresentado ao XIV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária em São Paulo, outubro de 1974.

** Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

*** Departamento de Patologia e Clínica Médicas da FMVZ - USP.

**** Ex-estagiária do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ - USP.

camâra de contagem de plancto segundo Tsunoda & Ishii(18).

Dois animais receberam uma suspensão de fezes por via oral, contendo aproximadamente 3.600 esporocistos; dois outros foram inoculados com 36.000 esporocistos e os dois restantes mantidos como controle, sem inoculação. As fezes foram coletadas e examinadas diariamente, durante 20 dias.

Resultados e Discussão

Das 155 amostras de fezes de cães diversos, nove (5,8%) deram resultados positivos para esporocistos de *Sarcocystis* sp. Esses esporocistos apresentavam-se sob forma elíptica, esporulada, incolor, sem corpúsculo de Stieda, sem micrópila, com quatro esporozoítas e um corpúsculo residual (Fig. 1), ou ainda aos pares, envolvidos por uma delgada membrana (Fig. 2). O tamanho dos esporocistos foi de $13,0\text{-}16,7 \times 10,4\text{-}11,1 \mu\text{m}$ e o tamanho médio de $15,0 \times 10,8 \mu\text{m}$.

O exame dos cães inoculados experimentalmente e dos controles não revelou a presença de esporocistos no período de 20 dias de observação.

Os esporocistos encontrados nas amostras correspondem, pela morfologia e dimensões, aos de *Sarcocystis fusiformis*, descritos por Heydorn & Rommel(6), em fezes de cães experimentalmente infectados com esôfago de bovinos contendo cistos do parasita, para os quais as dimensões foram dadas como sendo de $13,9\text{-}17,0 \times 6,2\text{-}10,8 \mu\text{m}$ $\bar{x} = 15,9 \times 8,3 \mu\text{m}$.

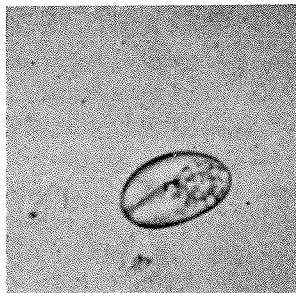


Fig. 1 — Esporocistos de *Sarcocystis* sp. nas fezes dos cães.

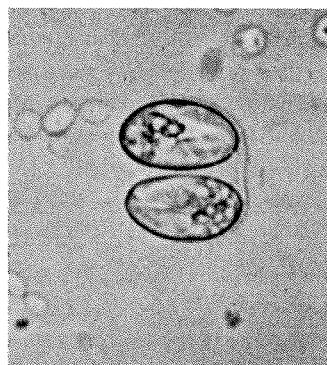


Fig. 2 — Oocisto de *Sarcocystis* sp. nas fezes dos cães.

Esporocistos com características similares e com as dimensões de $14,8\text{-}17,3 \times 8,7\text{-}9,9 \bar{x} = 16,0 \times 9,8 \mu\text{m}$ foram encontrados nas fezes de cães Beagle mantidos em estabelecimento comercial(10). O autor conclui que se tratavam de esporocistos de *Sarcocystis* e admite, como provável fonte de infecção, o alimento dos cães (órgãos de bovinos, administrados crus).

Levine & Ivens(9) assinalaram a presença de esporocistos livres, totalmente desenvolvidos nas fezes recém colhidas de quatro, entre 139 amostras de cães. Os esporocistos foram identificados como sendo da espécie *Isospora rivolta*; mas de acordo com suas dimensões ($15\text{-}17 \times 10\text{-}11 \mu\text{m}$) e características, poderiam ser de *Sarcocystis*.

As inoculações experimentais, realizadas no presente estudo, não deram exames positivos para a presença de esporocistos. Se se tratasse de esporocistos livres de *Isospora*, como assinalaram Levine & Ivens(9) deveriam aparecer novos elementos nas fezes, no prazo de seis dias após a inoculação(1, 8), o que não ocorreu.

Segundo a literatura, a transmissão de *Sarcocystis*, de cão para cão(1, 4), ou de gato para gato(4), através da inoculação de esporocistos, ainda não foi totalmente confirmada. Fischle(4) não conseguiu, por exemplo, infestar cães e gatos por inoculação oral de esporocistos de *S. fusiformis* e de *S. tenella*, respectivamente. O mesmo autor também tentou a infecção de gato com esporocistos e com órgãos do citado animal inoculado com esporocistos. No presente experimento também verificou-se a ausência de esporocistos nas fezes, concluindo-se que, no ciclo evolutivo de *Sarcocystis*, é necessário um hospedeiro intermediário, como ocorre com *Toxoplasma gondii*.

Não obstante os dados negativos, com as inoculações experimentais em cães e gatos, deve-se levar em consideração os trabalhos de Sahasrabudhe & Shah(17), que descreveram a presença de cistos de *Sarcocystis* na musculatura do esôfago de um cão e o de Jeffrey(7), que descreveu dois casos humanos e fez a citação de vários outros.

Desconhecemos o significado real dos nossos achados nos cães (5,8% eliminando esporocistos nas fezes), em vista dos atuais conhecimentos acerca do parasita. Conforme a literatura revisada, a ocorrência de sarcosporidiose nos animais é muito elevada (11, 13); e no homem, é mais difundida do que nos levam a supor as publicações existentes (7).

Além disso, segundo Gestrich & col.(5), há evidências da existência de pelo menos três espécies diferentes de *Sarcocystis* em bovinos e duas em ovinos, e que cães e gatos constituem hospedeiros definitivos de *Sarcocystis* de bovinos e ovinos. O homem é considerado hospedeiro definitivo de *Sarcocystis* de bovinos(5, 14) e suínos(14).

É necessário continuar com os estudos, no sentido de evidenciar o real papel dos cães e gatos na transmis-

são de *Sarcocystis* para outros animais, e, principalmente, o papel desses animais em relação à infecção do homem.

A alta ocorrência de sarcosporidiose em animais, em relação ao número de hospedeiros definitivos, também carece de respostas até o presente momento.

O presente trabalho, através da análise parasitológica de amostras de fezes de cães que ocorrem em diferentes regiões de São Paulo, revela a presença do parasita em condições naturais.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos aos Professores Doutores Adayr Mafuz Saliba, Mário Mariano, Tamara Nikitin e Jorge Guerrero Ramirez pela valiosa colaboração prestada na realização do presente trabalho.

Referências Bibliográficas

1. FAYER, R. — Development of *Sarcocystis fusiformis* in the small intestine of the dog. *J. Parasitol.*, 60:660-665, 1974.
2. FAYER, R. & JOHNSON, A.J. — Development of *Sarcocystis fusiformis* in calves infected with sporocysts from dogs. *J. Parasitol.*, 59:1135-1137, 1973.
3. FERREIRA, L.F.; MORTEO, R.E.; SILVA, J.R. — Padronização de técnicas para exame parasitológico das fezes, *J. Bras. Med.*, 6:241-257, 1962.
4. FISCHLE, B. — Investigation of the possibility of sporocysts excretion in cats and dogs given *Sarcocystis tenella* and *Sarcocystis fusiformis* sporocysts in their food. Untersuchungen über die Mögliund Hund nach Verfütterung von *Sarcocystis tenella* und *Sarcocystis fusiformis* — Sporozysten. *Inaugural Dissertation*, Freie Universität, Berlin, p. 27, 1973 apud *Vet. Bull.*, 43:559, 1973.
5. GESTRICH, R.; HEYDORN, A.O. & BAYSU, N. — Experimental differentiation of various species of *Sarcocystis fusiformis* and *Sarcocystis tenella*. Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien VI. Untersuchungen zur artendifferenzierung bei *Sarcocystis fusiformis* und *Sarcocystis tenella*. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 88:201-204, 1975.
6. HEYDORN, A.O. & ROMMEL, M. — Contributions to the life-cycle of the Sarcosporidia. II — Developmental stages of *S. fusiformis* in the alimentary tract and in the faeces of dogs and cats. Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. II — Hund und Katze als Überträger der Sarkosporiden des Rindes. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 85:121-123, 1972.
7. JEFFREY, H.C. — Sarcosporidiosis in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68:17-29, 1974.
8. LEVINE, N.D. — Protozoan parasites of domestic animals and of men. 2nd edition. Burgess Publishing Company, 1973.
9. LEVINE, N.D. & IVENS, V. — Species of *Isospora* in the dog. *J. Parasitol.*, 51(Suppl.):17, 1965.
10. MAHRT, J.L. — *Sarcocystis* in dogs and its probable transmission from cattle. *J. Parasitol.*, 59:588-589, 1973.
11. MESHKOV, S. — Sarcosporidia and sarcosporidioses in farm animals. I. Sarcosporidia in sheep. Sarkosporidii i sarkosporidiozi po sels kostopauskite zhivotni I. *Veterinarnomeditsinsk Nauki*, Sofia, 10:73-81, 1973. Apud *Vet. Bull.*, 43:618, 1973.
12. MUNDAY, B.L. & CORBOULD, A. — The possible role of the dog in the epidemiology of ovine sarcosporidiosis. *Br. Vet. J.*, 130:IX-XI, 1974.
13. PEZZAT, M.M. — Frecuencia de *Sarcocystis* spp. en corazones de bovinos *Veterianaria*, Mexico, 11:6-11, 1971.
14. ROMMEL, M. & HEYDORN, A.O. — Contributions to the life-cycle of the Sarcosporidia. III — *Isospora hominis* (Railliet and Lucet, 1891) Wenyon 1923, the sporocyst of the Sarcosporidia of cattle and swine. Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. III — *Isospora hominis* (Railliet und Lucet, 1891) Wenyon, 1923, eine Dauerform der Sarkosporidien des Rindes und des Schweins. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 85:143-145, 1972.
15. ROMMEL, M.; HEYDORN, A.O. & GRUBER, F. — Contributions to the life cycle of the Sarcosporidia. I — The sporocyst of *S. tenella* in the faeces of the cat. Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. I — Die Sporozyste von *S. tenella* in den Fäzes der Katze. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 85:101-105, 1972.
16. RYNALTOVSKII, O.V.; DUDKINA, A.V. & RUBINA, A.P. — Life-cycle of *Sarcocystis* (experimental infection of kittens). Kvoprosy o tsikle razvityya sarkotsist. *Veterinariya*, Moscow, n° 11 pp. 71, 1973.
17. SAHASRABUDHE, V.K. & SHAH, H.L. — The occurrence of *Sarcocystis* sp. in the dog. *J. Protozool.*, 13:531, 1966.
18. TSUNODA, K. & ISHII, T. — Métodos laboratoriais para a pesquisa de eimerias. *Keibyō Kenkyukai*, 1971.
19. VERSHININ, I.I. — Life cycle of *Sarcocystis tenella*. O tsikle razvityiya *Sarcocystis tenella*. *Veterinariya*, Moscow, n° 10, pp. 75-78, 1973.

Atividade "in vitro" da sisomicina contra amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, enterobactérias e de outras espécies bacterianas resistentes e sensíveis à gentamicina

Laurinda A. Soares* & Luiz R. Trabulsi**

Resumo

Estudo da atividade da sisomicina pelo método da diluição em placa contra 20 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, 99 de diferentes gêneros de enterobactérias e 10 de outras espécies bacterianas. Das 129 amostras, 71 eram resistentes e 58 sensíveis à gentamicina. A sisomicina foi mais ativa do que a gentamicina para 63,3% das amostras resistentes e 31,0% das amostras sensíveis. Foi menos ativa para 12,6% das bactérias resistentes e 8,6% para as amostras sensíveis. A atividade das duas drogas foi igual para 23,9% das amostras resistentes e 60,3% das sensíveis. A maior atividade da sisomicina entre as amostras resistentes à gentamicina se faz notar principalmente contra as amostras de *P. aeruginosa*, *Klebsiella* e *Proteus*. Entre as sensíveis, foi mais ativa contra *P. aeruginosa* e *Alcaligenes*. As amostras de *Enterobacter*, sensíveis e resistentes à gentamicina, foram uniformemente mais resistentes à sisomicina. A atividade da sisomicina para as demais amostras foi variável, semelhante à da gentamicina. A resistência cruzada entre os dois antibióticos é freqüentemente do tipo parcial.

Summary

"In vitro" activity of sisomicin against strains of Pseudomonas aeruginosa, several enterobacteria and other bacterial species both resistant and susceptible to gentamicin

Sisomicin activity was studied against 20 strains of *Pseudomonas*, 99 of different genera of *Enterobacteriaceae* and 10 of other bacterial species, using the agar dilution method. Out of the 129 strains, 71 were resistant and 58 susceptible to gentamicin. Sisomicin was more active than gentamicin for 63,3% of the resistant strains and 31,0% of the susceptible strains. It was less active for 12,6% of the resistant strains and 8,6% of the susceptible ones. The activity of both antibiotics was the same for 23,9% of the resistant strains and 60,3% of the susceptible strains. The greatest activity of sisomicin among resistant strains to gentamicin was noted mainly against strains of *P. aeruginosa*, *Klebsiella* and *Proteus*. Among the susceptible strains it was more active against *P. aeruginosa* and *Alcaligenes*. *Enterobacter* strains, susceptible and resistant to gentamicin, were regularly more resistant to sisomicin. Sisomicin activity for the other strains was variable, similar to the one found for gentamicin. Cross-resistance between both antibiotics is frequently of the partial type.

Introdução

A sisomicina é um novo antibiótico aminoglicosídeo obtido da fermentação da *Micromonospora inyoensis* (8, 10). Esse antibiótico se assemelha à gentamicina C_{1a'}, um dos componentes do complexo da gentamicina. Sua ação "in vitro" é similar à da gentamicina, não sendo, entretanto, idêntica. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a sensibilidade à sisomicina de amostras de várias espécies bacterianas resistentes à gentamicina por diferentes mecanismos genéticos. Para efeito de comparação, foram também estudadas amostras sensíveis ao mesmo antibiótico.

Material e Métodos

Amostras — Foram estudadas 129 amostras, distribuídas da seguinte forma:

- a. quatro amostras de *Enterobacter*, cinco de *Klebsiella* e uma de *Proteus mirabilis*, resistentes a pelo menos 4 mcg/ml de gentamicina e portadoras de fator R com genes de resistência para gentamicina;
- b. 10 de *E. coli* K12, resistentes à gentamicina e derivadas das amostras do item a;
- c. 19 mutantes para resistência à gentamicina, obtidas a partir de amostras sensíveis de *Klebsiella*, *Salmonella*, *P. mirabilis* e *P. vulgaris*;

* Laboratório de Microbiologia da Bayer do Brasil S.A.; Caixa Postal 959, 01000 São Paulo SP.

** Depto. de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, São Paulo SP.

- d. 12 de *Pseudomonas aeruginosa* e 20 de enterobactérias isoladas de material clínico e resistentes a gentamicina, desconhecendo-se a natureza genética da resistência;
- e. seis de *S. aureus*, oito de *Pseudomonas*, quatro de *Alcaligenes sp* e 40 de diferentes enterobactérias, sensíveis a pelo menos 4 mcg/ml de gentamicina.

Além das amostras mencionadas, verificou-se a concentração inibitória da gentamicina para 20 mutantes selecionadas em placa contendo sisomicina.

Drogas — Foram usados sulfato de sisomicina (Bayer) e sulfato de gentamicina (Schering).

Determinação da concentração inibitória — O método empregado foi o da diluição em placa, usando-se um inóculo de aproximadamente 10^4 gérmenes/ml. O meio de cultura foi o de Mueller Hinton (Difco). As amostras isoladas de material clínico foram consideradas sensíveis à gentamicina quando tinham o seu crescimento inibido por pelo menos 4 mcg/ml. Para as mutantes e recombinantes, o critério adotado para classificá-las como resistentes foi simplesmente o aumento da resistência com relação ao tipo selvagem.

Obtenção de mutantes — Para a obtenção de mutantes utilizou-se o método de Szybalsky & Bryson (6). Foram obtidas mutantes para sisomicina e gentamicina a partir de uma amostra de *Klebsiella*, uma de *Salmonella*, uma de *Proteus mirabilis* e uma de *Proteus vulgaris*, sensíveis a menos de 1 mcg/ml de gentamicina e de sisomicina. O meio de cultura foi o DST (Oxoid), e tanto a gentamicina como a sisomicina foram usadas na concentração de 5 mcg/ml. Foram considerados mutantes os clones que apresentaram resistência superior à da amostra selvagem.

Demonstração do fator R — A presença do fator R, com genes de resistência para gentamicina, foi demonstrada por meio de conjugação em amostras de *Enterobacter*, *Klebsiella* e *P. mirabilis*, sensíveis ao ácido nalidíxico. A cultura receptora foi uma amostra de *E. coli* K12, lactose-negativa, resistente a 50 mcg/ml de ácido nalidíxico e sensível a todos os antibióticos. A seleção dos recombinantes foi feita em placa de agar Mueller Hinton e de MacConkey, contendo ácido nalidíxico e gentamicina. As colônias de recombinantes foram identificadas como *E. coli* pelas características bioquímicas. Simultaneamente a cada experimento de conjugação foram feitos os controles indicados (7).

Resultados

Encontram-se na Tabela 1 as concentrações inibitórias da sisomicina para as amostras resistentes à gente-

micina por fatores R, por mutação e por mecanismos genéticos desconhecidos. Com relação aos primeiros, verifica-se que as amostras de *Enterobacter* foram menos sensíveis à sisomicina, enquanto que as 5 de *Klebsiella* e a de *P. mirabilis* foram mais sensíveis, com exceção de uma amostra de *Klebsiella*, que apresentou sensibilidade igual aos dois antibióticos. Quanto às amostras de *E. coli* K12, as concentrações inibitórias de sisomicina foram maiores ou iguais às de gentamicina para os recombinantes derivados de *Enterobacter*, e menores ou iguais para os derivados de *Klebsiella* e *P. mirabilis*. Com relação às mutantes, observa-se que uma de *Salmonella* foi mais resistente à sisomicina, três de *Salmonella* e uma de *P. mirabilis* apresentaram sensibilidade igual às duas drogas e que as 14 restantes foram mais sensíveis à sisomicina. Das 32 amostras com resistência por mecanismos genéticos desconhecidos, 22 foram mais sensíveis à sisomicina, três menos e sete apresentaram a mesma sensibilidade às duas drogas. Deve ser notado que as três amostras menos sensíveis à sisomicina são de *Enterobacter*, e que entre as sete com sensibilidade igual às duas drogas, quatro são de *Salmonella*, uma de *P. aeruginosa*, uma de *Klebsiella* e a outra de *E. coli*. A diferença entre as concentrações inibitórias de sisomicina e de gentamicina para a mesma amostra nunca foi superior a quatro. Considerando-se as 71 amostras resistentes, verifica-se ainda na Tabela 1 que 45 (63,3%) foram mais sensíveis à sisomicina, nove (12,6%) foram menos sensíveis e 17 (23,9%) apresentaram a mesma sensibilidade às duas drogas.

Os resultados referentes às amostras sensíveis à gentamicina podem ser vistos na Tabela 2. A sisomicina foi mais ativa para as amostras de *P. aeruginosa* e de *Alcaligenes sp*, foi mais ativa ou apresentou atividade igual à da gentamicina para as amostras de *Klebsiella*, *E. coli*, *Salmonella* e *P. vulgaris*, e foi menos ativa ou apresentou sensibilidade igual à de gentamicina para as amostras de *P. mirabilis*, *Providencia* e *S. aureus*. Consideradas em conjunto, das 58 amostras sensíveis à gentamicina, 18 (31,0%) foram mais sensíveis à sisomicina, cinco (8,6%) foram menos sensíveis e 35 (60,3%) apresentaram a mesma sensibilidade às duas drogas. A diferença entre as concentrações inibitórias das duas drogas para a mesma amostra nunca foi superior a dois.

Na Tabela 3 estão os resultados obtidos com todas as amostras, independentemente de serem sensíveis ou resistentes à gentamicina. Observa-se que 48,9% das amostras foram mais sensíveis à sisomicina, 10,8% menos e 40,3% apresentaram a mesma sensibilidade às duas drogas. Deve-se destacar que a sisomicina foi mais ativa para a totalidade das amostras de *P. aeruginosa*, *Klebsiella*, *P. vulgaris* e *Alcaligenes sp*, e que foi menos ativa para as amostras de *Enterobacter*.

Na Tabela 4 verifica-se que todas as mutantes para sisomicina foram de duas a oito vezes mais resistentes à gentamicina.

Tabela 1

Atividade da Sisomicina contra amostras de Enterobactérias e *P. aeruginosa* resistentes à Gentamicina por diferentes mecanismos genéticos

Bactérias	Mecanismo de resistência	Amostras	Concentração inibitória (mcg/ml)		Número de amostras		
			Gentamicina	Sisomicina	Mais sensível	Gentamicina	Sisomicina
Enterobacter*	Fator R	1, 2, 3, 4	8,0	16,0	4	0	0
Klebsiella*	Fator R	1 2,3 4,5	64,0 64,0 32,0 16,0	64,0 32,0 16,0	0	4	1
<i>P. mirabilis</i> *	Fator R	1	32,0	16,0	0	1	0
<i>E. coli</i> (E**)	Fator R	1, 2, 3 4	4,0 4,0	4,0 8,0	1	0	3
<i>E. coli</i> (K**)	Fator R	1, 2 3, 4, 5	2,0 4,0	2,0 2,0	0	3	2
<i>E. coli</i> (Pm**)	Fator R	1	16,0	8,0	0	1	0
Klebsiella	Mutação	1 2, 3, 4, 5	1,0 4,0	0,5 2,0	0	5	0
Salmonella	Mutação	1 2, 3, 4	1,0 2,0	2,0 2,0	1	0	3
<i>P. mirabilis</i>	Mutação	1 2,3 4,5	2,0 4,0 4,0	2,0 2,0 1,0	0	4	1
<i>P. vulgaris</i>	Mutação	1, 2, 3 4,5	4,0 8,0	2,0 4,0	0	5	0
<i>P. aeruginosa</i>	Desconhecido	1,2 3, 4, 5, 6, 7, 8 9, 10, 11 12	8,0 8,0 16,0 32,0	2,0 4,0 8,0 32,0	0	11	1
Klebsiella	Desconhecido	1 2 3 4,5 6, 7, 8 9	8,0 32,0 16,0 64,0 64,0 64,0	4,0 8,0 8,0 16,0 32,0 64,0	0	8	1
Salmonella	Desconhecido	1 2, 3, 4, 5	64,0 64,0	32,0 64,0	0	1	4
Enterobacter	Desconhecido	1,2 3	8,0 32,0	16,0 64,0	3	0	0
<i>E. coli</i>	Desconhecido	1 2	16,0 64,0	4,0 64,0	0	1	1
<i>P. mirabilis</i>	Desconhecido	1	32,0	16,0	0	1	0
Total - 71					9	45	17
%					12,6%	63,3%	23,9%

* Doadoras

** Recombinantes derivadas de Enterobacter (E), Klebsiella (K) e *P. mirabilis* (Pm).

Tabela 2

Atividade da Sisomicina contra amostras de *P. aeruginosa*, Enterobactérias e de outras espécies bacterianas sensíveis à Gentamicina

Bactérias	Amostras	Concentração inibitória (mcg/ml)		Número de Amostras		
				Mais sensíveis		Sensibilidade igual às 2 drogas
		Gentamicina	Sisomicina	Gentamicina	Sisomicina	
<i>P. aeruginosa</i>	1,2,3,4,5,6, 7,8	4,0	2,0	0	8	0
<i>Klebsiella</i>	1	0,5	0,25			
	2, 3, 4	0,5	0,5			
	5	1,0	0,5	0	3	4
	6	1,0	1,0			
	7	2,0	1,0			
<i>E. coli</i>	1	0,25	0,25			
	2	0,5	0,25	0	2	7
	3,4,5,6,7,8	0,5	0,5			
	9	1,0	0,5			
<i>P. mirabilis</i>	1	0,25	0,5			
	2, 3, 4	0,5	0,5			
	5,6	0,5	1,0	3	0	13
	7,8,9,10,11,12, 13, 14, 15, 16	1,0	1,0			
<i>P. vulgaris</i>	1, 2, 3	0,5	0,5	0	0	3
<i>Providencia</i>	1	1,0	0,5			
	2	2,0	4,0	1	1	0
<i>Enterobacter</i>	1	0,5	2,0			
	2	4,0	4,0	1	0	1
<i>Salmonella</i>	1	0,5	0,5	0	0	1
<i>Alcaligenes</i>	1, 2, 3	2,0	1,0			
	4	4,0	2,0	0	4	0
<i>S. aureus</i>	1, 2, 3	0,1	0,1			
	4, 5, 6	0,25	0,25	0	0	6
Total	58			5	18	35
%				8,6%	31,0%	60,3%

Discussão

Embora pequenas, e algumas podendo ser decorrentes do método empregado, a constância das diferenças indica que a sisomicina foi mais ativa do que a gentamicina. A maior atividade frente às amostras resistentes à gentamicina é explicada principalmente pela dualidade de ação para as amostras de *Proteus* e *Klebsiella*. Conforme pode ser visto nas Tabelas 1 e 2, a quase totalidade das amostras resistentes dessas bactérias foi mais sensível à sisomicina, enquanto que as amostras sensíveis freqüentemente apresentaram a mesma sensibilidade para as duas drogas. Algumas vezes foram mesmo mais sensíveis à

gentamicina, como aconteceu com três amostras de *P. mirabilis*. A espécie ou gênero das amostras influenciou a atividade dos dois antibióticos. Considerando-se as amostras resistentes, a sisomicina foi mais ativa do que a gentamicina para as amostras de *Klebsiella*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris*. Foi uniformemente menos ativa contra as amostras de *Enterobacter*. Com relação às amostras sensíveis, a situação é idêntica apenas para as amostras de *P. aeruginosa* e *Alcaligenes*, e *Enterobacter*, respectivamente.

Tabela 3

Atividade da Sisomicina contra amostras de *P. aeruginosa*, Enterobactérias e de outras espécies bacterianas resistentes e sensíveis à Gentamicina

Bactérias	Número de amostras estudadas	Número mais sensível à Sisomicina	Número mais sensível à Gentamicina	Número com sensibilidade igual às 2 drogas
<i>P. aeruginosa</i>	20	19	0	1
<i>Klebsiella</i>	26	20	0	6
<i>E. coli</i>	21	7	1	13
<i>P. mirabilis</i>	23	6	3	14
<i>P. vulgaris</i>	8	5	0	3
Providencia	2	1	1	0
Enterobacter	9	0	8	1
Salmonella	10	1	1	8
Alcaligenes	4	4	0	0
<i>S. aureus</i>	6	0	0	6
Total	129	63	14	52
%		48,9	10,8	40,3

Tabela 4

Atividade da Gentamicina contra mutantes de Enterobactérias selecionadas em placas contendo Sisomicina

Bactérias	Mutantes	Concentração inibitória (mcg/ml)	
		Sisomicina	Gentamicina
<i>Klebsiella</i>	1, 2, 3	2,0	8,0
	4	4,0	8,0
	5	2,0	16,0
<i>Salmonella</i>	1, 2, 3	1,0	4,0
	4	2,0	4,0
	5	8,0	16,0
<i>P. mirabilis</i>	1, 2, 3	2,0	4,0
	4	2,0	4,0
	5	4,0	8,0
<i>P. vulgaris</i>	1,2	2,0	4,0
	3	2,0	8,0
	4,5	8,0	16,0

De modo geral, os resultados de estudos semelhantes encontrados na literatura indicam maior atividade da

sisomicina para a maioria das bactérias gram-negativas, quando comparadas com a gentamicina (1, 2, 3, 4, 5, 9, 11). Entretanto Meyers e cols. (4) encontraram a sisomicina mais ativa contra amostras de *Pseudomonas sp*, *Klebsiella* e *Proteus* indol positivo, e menos contra amostras de *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Serratia* e *Proteus mirabilis*. Embora não tenhamos encontrado referências específicas a uma maior atividade da sisomicina para germes resistentes à gentamicina, é interessante mencionar os achados de Crowe & Sanders (1) para uma amostra de *P. mirabilis* e quatro amostras de *P. rettgeri*. A concentração inibitória da gentamicina para essas amostras variava entre 12,5 e 50 mcg/ml, enquanto que a da sisomicina variava entre 1,56 e 6,25 mcg/ml. Ainda de maneira semelhante a nós, verificaram que uma amostra de *Enterobacter* sensível a 6,25 mcg/ml de gentamicina só o era a 50 mcg/ml de sisomicina.

A maior atividade da sisomicina para mutantes selecionadas em placas contendo gentamicina contrasta, conforme seria de se esperar, com a menor atividade da gentamicina para mutantes selecionadas em placas contendo sisomicina (Tabela 4). Esses dados, juntamente com os referentes às amostras resistentes à gentamicina (Tabela 1), indicam que a resistência cruzada entre os dois antibióticos é mais do tipo parcial, isto é, as bactérias resistentes à gentamicina nem sempre o são à sisomicina.

micina. Entretanto as resistentes à sisomicina devem ser também para gentamicina.

Os menores níveis de resistência expressos pelas amostras de *E. coli* K12 derivadas das amostras de *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Proteus mirabilis* parecem inerentes

à própria bactéria, com relação aos aminoglicosídeos. Toledo & cols. (7) verificaram que a mesma bactéria expressava níveis mais baixos de resistência à estreptomicina e kanamicina após receber diferentes fatores R de amostras de *Shigella*.

Referências Bibliográficas

1. CROWE, C.C. & SANDERS, E. — Sisomicin: evaluation in vitro and comparison with gentamicin and tobramycin. *Antim. Agents Chemoth.*, 3:24-28, 1973.
2. HYAMS, P.J.; SIMBERKOFF, M.J. & RAHAL, J.J. — In vitro bactericidal effectiveness of four aminoglycoside antibiotics. *Antim. Agents Chemoth.*, 3:87-94, 1973.
3. KLASTERSKY, J.; HENRI, A.; HENSGENS, C.; VANDENBORRE, L. & DANEAU, D. — Antipseudomonal drugs: comparative study of gentamicin, sisomicin and tobramycin in vitro and in human volunteers. *Europ. J. Cancer*, 9:641-648, 1973.
4. MEYERS, B.R.; LENG, B. & HIRSCHMAN, S.Z. — Comparison of the antibacterial activities of sisomicin and gentamicin against gram negative bacteria. *Antim. Agents Chemoth.*, 8:757-758, 1975.
5. SCHASSAN, H.H. — Die antimikrobielle Wirksamkeit von Sisomicin. I. In-vitro-Aktivität von Sisomicin in Vergleich mit Gentamicin, Tobramycin, Amikacin und Kanamycin. *Infection*, 4:35-41, 1976.
6. SZYBALSKI, W. & BRYSON, V. — Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *E. coli* to fifteen antibiotics. *J. Bacteriol.* 64:489-499, 1952.
7. TOLEDO, M.R.F.; ZULIANI, M.E. & TRABULSI, L.R. — Single and multiple transferable drug resistance among clinically isolated *Shigella* strains. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 1:1-11, 1970.
8. WAGMAN, G.H.; TESTA, R.T. & MARQUEZ, J.A. — Antibiotic 6640. II. Fermentation, isolation and properties. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 23:555-558, 1970.
9. WAITZ, J.A.; MOSS, E.L.; DRUBE, C.G. & WEINSTEIN, M.J. — Comparative activity of sisomicin, gentamicin, kanamycin and tobramycin. *Antim. Agents Chemoth.*, 2:431-437, 1972.
10. WEINSTEIN, M.J.; MARQUES, J.A.; TESTA, R.T.; WAGMAN, G.H.; ODEN, E.M. & WAITZ, J.A. — Antibiotic 6640, a new *Micromonospora* produced aminoglycoside antibiotic. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 23:551-554, 1970.
11. YOUNG, L.S. & HEWITT, W.L. — Activity of five aminoglycoside antibiotics in vitro against gram-negative bacilli and *Staphylococcus aureus*. *Antim. Agents Chemoth.*, 4:617-625, 1973.

