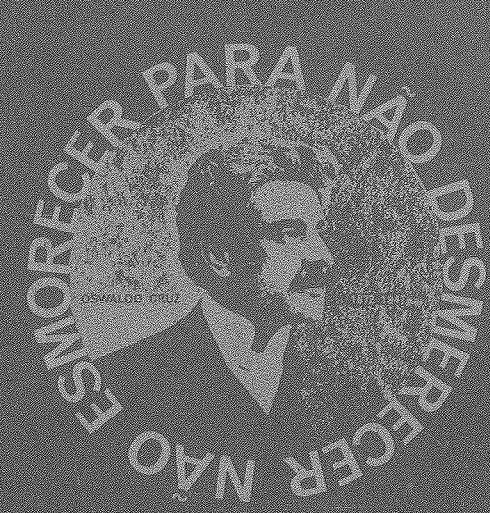


Volume 8 Número 4 Out.-Dez. 1977

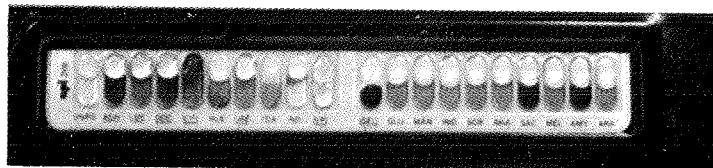
Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo – Brasil



api system

abriu o caminho da estandardização na identificação bacteriológica.



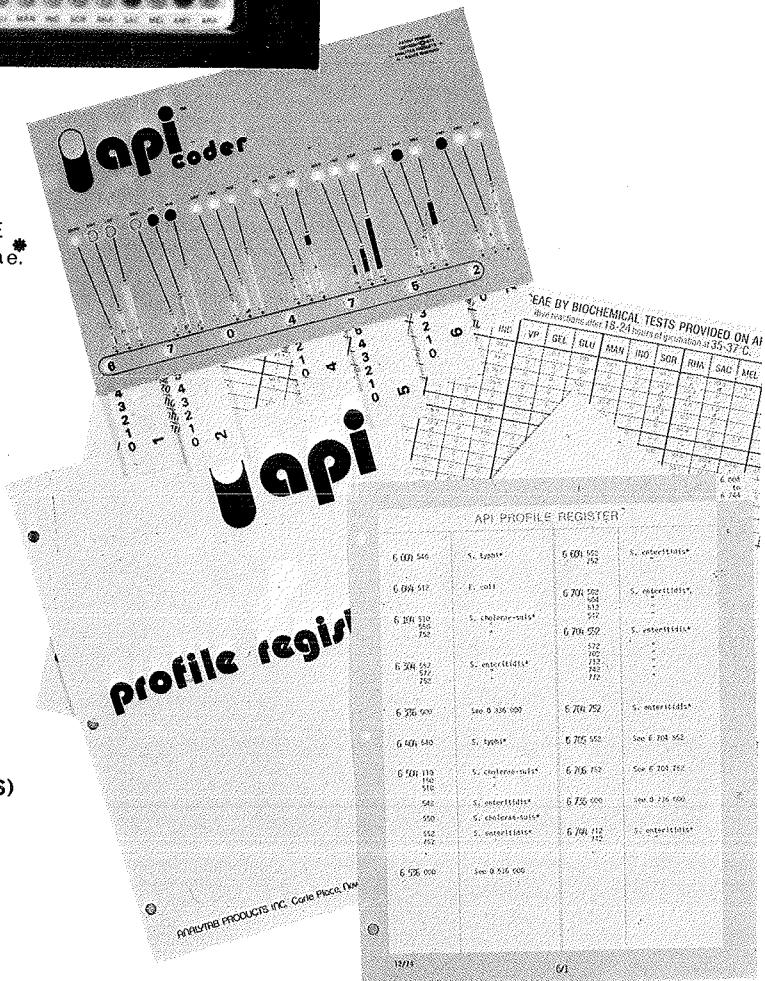
API 20 E e o SISTEMA DE LEITURA CODIFICADA põem à disposição dos laboratórios mais de 25.000 cepas registradas de ENTEROBACTERIACEAE e outros GRAM (não-Enterobacteriaceae).* Esse é o resultado de vários anos de colaboração entre utilizadores, centros de referência e os serviços de pesquisa API na França 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. Christóvão, 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 Parelha Ruiz (Londrina). PERNAMBUCO: Diva Montenegro Melo de Azevedo (Recife) e Marcelo Magalhães (Recife). RIO GRANDE DO NORTE: Maria Raquel dos Santos (Natal). RIO GRANDE DO SUL: Sérgio Job Jobim (Porto Alegre) Newton Neves da Silva (Porto Alegre) e Tabajara Gaúcho da Costa (Santa Maria). RIO DE JANEIRO: Cláudio Armando Jürgensen (Nilópolis). SANTA CATARINA: Aquilles A. Cordova Santos (Florianópolis). SÃO PAULO: Deise Pasetto Falcao (Araraquara), Flávio Althertum (São Paulo), Augusto Cezar Montelli (Botucatu) Izabel Yoko Ito (Ribeirão Preto) e Edécio Maluf (Sorocaba). SERGIPE: Raimundo Mendonça de Araujo (Aracaju).

Instruções aos autores

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

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

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

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

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

FORMA DO MANUSCRITO — Os trabalhos devem ser datilografados em papel branco, comum, tamanho ofício, em espaço duplo ou triplo, deixando-se o mínimo de 3 cm de margens laterais, superior e inferior. Títulos de capítulos de primeira ordem devem ser centrados, incluídos essencialmente pela ordem: **Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências Bibliográficas**. Os de subcapítulos devem ser junto à margem esquerda.

A **página-título** deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, centrado usando-se letras maiúsculas somente quando obrigatórias, (ii) o(s) nome(s) do(s) autor(es) com maiúsculas e minúsculas normalmente usadas e (iii) afiliação como nota de rodapé, indicada por asterisco.

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

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 8 Outubro-Dezembro 1977 Número 4

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 8(4)

CONTEÚDO – CONTENTS

Artigos originais

Programa institucional "Prêmios SBM em biologia de microrganismos" — João S. Furtado	102
Comparação antigênica entre <i>Tritrichomonas suis</i> e <i>T. foetus</i> — III imuno-eletroforese (IEF) [Antigenic comparison between <i>Tritrichomonas suis</i> and <i>T. foetus</i> — III Immuno-electrophoresis (IEF)] — Geraldo A. De Carli & Jorge Guerrero	107
Natureza genética da fermentação de lactose em amostras de <i>Salmonella typhimurium</i> [Genetics of lactose fermentation in strains of <i>Salmonella typhimurium</i>] — Maria Heloiza Trebilcock Affonso; Maria Regina Fernandes de Toledo & Luiz Rachid Trabulsi	110
Factores "R" que median resistencia para ampicilina-carbenicilina en <i>Citrobacter diversus</i> [R factors mediating for ampicillin and carbenicillin resistance in <i>Citrobacter diversus</i>] — Gustavo Prieto, Jeannette Vargas, Ada Martínez & Hilda Bracho	117
Estudos comparativos entre o teste da alça ligada de intestino de coelho e do camundongo recém-nascido na detecção da enterotoxina termoestável (ST) produzida por <i>Escherichia coli</i> [Comparative studies between the rabbit ileal loop assay and the infant mouse test to detect heat-stable enterotoxin (ST) produced by <i>Escherichia coli</i>] — Antonio de Pádua Franceschi, A.F. Pestana de Castro, Marlene B. Serafim & Luiz Pustiglione Netto	123
Titulação de anticorpos diftérico e tetânico pelo método de absorção de sangue integral em papel de filtro [Diphtheric and tetanic antibody titration by the method of blood absorption in filter paper] — Edison Paulo Tavares de Oliveira, Hideyo Izuka, Hisako Gondo Higashi & Joana Akiko Furuta Production of subtilopeptidase by a strain of <i>Bacillus subtilis</i> — R.M. Attia, Rawia F. Gamal & S.A.Z. Mahmoud	132
Ação da griseofulvina sobre a composição da parede celular em <i>Pycnoporus sanguineus</i> [Effect of griseofulvin on cell wall composition of <i>Pycnoporus sanguineus</i>] — Mioco F., Gomes & Sonia M.C. Dietrich	136

Notas breves

The influence of the host in the curing of a F'lac factor by acridine orange Maria Regina Fernandes de Toledo; Rosa Maria Silva, Regina Gomes de Almeida & Luiz Rachid Trabulsi	141
Amostras de <i>Escherichia coli</i> , de origem animal, produtoras de enterotoxina termoestável (ST) isoladas de casos de diarréia em São Paulo, SP, Brasil [Heat-stable enterotoxin-producing stains of <i>E. coli</i> of animal origin isolated from cases of diarrhea in São Paulo State, Brazil] — Margaretti Simões, Marlene B. Serafim; Angela C. Rodrigues, Waldyr Giorgi, Luiz Pustiglione Netto & A.F. Pestana de Castro	143
Frequency of <i>E. coli</i> 0136 and 0152 in faeces of children and adults living in the Recife area, Pernambuco, Brasil — Diva Montenegro Melo, Maria Regina Fernandes de Toledo & Luiz Rachid Trabulsi	145

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.

**Prêmios Sociedade Brasileira de Microbiologia
em Biologia de Microrganismos**

Prêmio Schering de Microbiologia

A Sociedade Brasileira de Microbiologia anuncia seu programa institucional "Prêmio SBM em Biologia de Microrganismos", para conceder honorárias e apoio financeiro a cientistas e tecnólogos envolvidos com vírus, bactérias, fungos, algas e protozoários.

O programa se iniciará pelo "**Prêmio Schering de Microbiologia**", para teses executadas por estudantes, a nível de Mestrado ou Doutoramento, regularmente matriculados em cursos oficialmente reconhecidos pelo Conselho Federal de Educação, do Ministério da Educação e Cultura.

O objetivo do "**Prêmio Schering de Microbiologia**" é motivar a criatividade e relevância, na definição de projetos, promovendo a microbiologia como instrumento para o desenvolvimento científico, social ou econômico, como segue:

- i. para o estudante — o teto de Cr\$ 5.000,00, anualmente corrigível, vinculado à aquisição de literatura técnico-científica;
- ii. ao orientador — o teto de Cr\$ 45.000,00, anualmente corrigível, vinculado à aquisição de passagem e ajuda de custos para estada em laboratório ou centro de pesquisa e desenvolvimento, no exterior, para cumprimento de programa mínimo de oito semanas, destinado à atualização profissional ou desenvolvimento de projetos em colaboração.

O "**Prêmio Schering de Microbiologia — 78'**" será distribuído durante o IX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, na Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, de 23 a 27 de julho de 1978.

Os prêmios subsequentes serão distribuídos em cada Congresso, anualmente. Como a data final para a apresentação dos textos completos se encerra a 30 de abril de 1978, os candidatos deverão solicitar informações a um dos seguintes endereços:

Sociedade Brasileira de Microbiologia
Dr. João S. Furtado
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

**Brazilian Society of Microbiology Awards on
Biology of Microorganisms**

Schering Award on Microbiology

The Brazilian Society of Microbiology announces its institutional program "SBM Prizes on Biology of Microorganisms", to award and support financially scientists and technologists dealing with viruses, bacteria, fungi, algae and protozoans.

The program will start by the "SCHERING AWARD ON MICROBIOLOGY" to theses made by students obtaining their MS, DcS or PhD titles, in centers officially recognized by the Brazilian Federal Council of Education, an agency of Brazilian Ministry of Education and Culture.

"Schering Award on Microbiology" intents to motivate creativity and relevance in project design, and to promote microbiology as an instrument for scientific, social or economical development. The prize will be divided as follows:

- i. for the student — the equivalent to US\$ 300.00, in Brazilian currency, restricted to purchase of technical or scientific literature;
- ii. for the professor or researcher acting as the student's scientific or technical advisor the equivalent to US\$ 2,700.00, in Brazilian currency, restricted to travel expenses, to cover a program of the minimum of eight weeks stay in foreigner laboratory or R & D center, for either up-dating or joint project development.

"Schering Award on Microbiology — 78'" is scheduled for judgment during the IX BRAZILIAN CONGRESS OF MICROBIOLOGY, at the Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, to take place on July 23-27, 1978.

Subsequent prizes will be awarded in each yearly Congress.

Since dead-line for complete paper submission is 30 April 1978 candidates are urged to request further information in either of the address below:

Indústria Química e Farmacêutica Schering S/A
Dr. Paulo H. Leal
Rua Morais e Silva, 43
Caixa Postal 540
20000 Rio de Janeiro

**Programa institucional
"Prêmios SBM em biologia de microrganismos"**

João S. Furtado*

A microbiologia — no consenso de seus mais representativos executores e na interpretação de todos os que já se envolveram com a direção da Sociedade Brasileira de Microbiologia — é uma das mais abrangentes áreas em ciência e tecnologia. Depende da atividade de vasta gama de especializações profissionais em pesquisa, desenvolvimento, prestação de serviços técnico-científicos e capacitação de recursos humanos. Está inserida em inúmeros planos de desenvolvimento e representa a resposta a diversas metas governamentais**, com tendência a se fortalecer na medida que seus executores aumentarem sua habilidade para diagnosticar necessidades científicas, sociais e econômicas.

A Sociedade Brasileira de Microbiologia congrega comunidade multiprofissional e procura criar e desenvolver mecanismos dedicados ao fortalecimento técnico-científico. Entre os esforços gerados, anuncia o programa institucional "Prêmios SBM em Biologia de Microrganismos", cuja regulamentação será modificada, sempre para melhorar o nível de motivação, concessão e efetiva utilização dos prêmios.

O futuro do programa será, inevitavelmente, da responsabilidade dos participantes e da qualidade de seus trabalhos, pois traduzirá, automaticamente, uma parte da pesquisa gerada no Brasil, através dos cursos de pós-graduação. Simultaneamente, o prêmio representará instrumento de promoção de seus executores e beneficiários, como agentes de transformação do meio.

1. Objetivos

- Aumentar a motivação profissional para o crescente melhoramento da orientação a estudantes de pós-graduação em microbiologia.
- Estimular maior criatividade, na geração de projetos de pesquisa e desenvolvimento.
- Criar subsídios que possam contribuir para a projeção da ciência brasileira, em âmbito internacional.
- Estimular a ação dos pesquisadores e tecnólogos para a solução de problemas regionais e a liberação

da dependência tecnológica nos setores produtivo e de prestação de serviço.

2. Requisitos

- 2.1. O prêmio destina-se a aluno regularmente matriculado em curso de pós-graduação reconhecido pelo Conselho Federal de Educação, do Ministério de Educação e Cultura.
- 2.2. O curso não deve ser, necessariamente, de microbiologia, mas o trabalho deverá envolver aspectos biológicos de vírus, bactérias, fungos, algas e protozoários.
- 2.3. O trabalho deverá constituir projeto de pesquisa ou de desenvolvimento experimental original e representar assunto de tese do candidato.
- 2.4. A defesa da tese a que se refere o item acima deverá estar compreendida no período entre a realização do último congresso da Sociedade Brasileira de Microbiologia e seis meses após o congresso durante o qual o julgamento será anunciado.
- 2.5. O trabalho submetido para concurso não poderá ser ressubmetido para julgamento nos dois anos seguintes ao da inscrição.
- 2.6. O candidato deverá submeter texto completo do trabalho até 30 de abril de cada ano em que o Congresso da Sociedade Brasileira de Microbiologia é realizado e fornecer os dados solicitados pela Secretaria de Normas para a inscrição.
- 2.7. Todos os trabalhos concorrentes deverão ser formalmente inscritos e apresentados em Congresso da Sociedade Brasileira de Microbiologia.
- 2.8. A apresentação será feita obrigatoriamente pelo aluno executor. Diante de qualquer pergunta, é vedado ao orientador participar do debate.
- 2.9. Ambos, aluno executor e orientador, deverão ser membros profissionais da Sociedade Brasi-

* Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01000 São Paulo; membro da diretoria da Sociedade Brasileira de Microbiologia.

** FURTADO, JOÃO S. — Microbiologia nos planos de governo: pesquisa e desenvolvimento. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 7 : 98-103, 1976.

leira de Microbiologia, inscritos até dezembro do ano anterior ao Congresso durante o qual o julgamento será realizado, e devidamente em dia com a tesouraria.

- 2.10. O prêmio ou suas partes são intransferíveis para outros nomes; não poderão ser modificados quanto ao destino a que estão vinculados e deverão ser respeitados os prazos máximos, para seu uso, previstos no item operacionalidade, inclusive no que diz respeito às consequências.

3. Natureza do Prêmio

O prêmio é constituído de documentos de honraria e recursos financeiros, descritos a seguir:

3.1. Diploma e outros documentos

A Sociedade Brasileira de Microbiologia concederá o "Diploma de Mérito Oswaldo Cruz", ao estudante premiado, e certificado apropriado a orientador.

3.2. Recursos financeiros

- a) *ao estudante executor* — a cada ano, determinado número de unidades de Cr\$ 1.000,00 serão concedidas, de maneira a representar, recurso razoável para a aquisição de literatura técnico-científica no campo de atuação do premiado. O valor será definido no anúncio do prêmio, a cada ano.
- b) *ao orientador* — a cada ano, serão concedidas unidades de Cr\$ 1.000,00 destinadas ao custeio de passagem aérea, classe econômica, ao orientador do trabalho premiado, e despesas de estada, para que este possa visitar laboratório ou centro de pesquisa e desenvolvimento no exterior. O número de unidades será anualmente anunciado.

4. Metas

A Sociedade Brasileira de Microbiologia deseja distribuir um (1) prêmio a cada ano e desenvolverá esforços visando diversificar o número de patrocinadores.

A meta final será a criação de um prêmio a cada uma das seguintes áreas:

- microbiologia agrícola
- microbiologia de alimentos
- microbiologia ambiental
- microbiologia básica
- microbiologia industrial
- microbiologia médico-veterinária
- microbiologia em saúde pública

5. Operacionalidade

A Sociedade Brasileira de Microbiologia organizará estrutura especial para a execução das atividades ligadas ao prêmio, conforme está descrito no item 8, composta de:

- Secretaria de normas
- Comissão deliberativa
- Comissão de outorga
- Comissão de avaliação de resultados
- Secretaria de divulgação

A seqüência operacional será descrita a seguir.

- 5.1. O candidato deverá submeter o texto completo de seu trabalho até 30 de abril de cada ano que antecede o Congresso.
- 5.2. O trabalho deverá ser acompanhado da seguinte documentação:

- X a) carta endereçada à Sociedade Brasileira de Microbiologia, solicitando a inscrição para o prêmio, a qual deverá conter os seguintes dados, pela ordem abaixo relacionada:

1. nome
2. filiação
3. sexo
4. nacionalidade
5. R.G.
6. C.I.C.
7. entidade na qual está cursando a pós-graduação (endereço completo)
8. nome do curso de pós-graduação
9. nome do orientador efetivo da tese
10. nome e endereço da entidade com a qual o orientador tem vínculo empregatício (se for a mesma instituição do item 7, basta citar o nome da entidade)
11. título do projeto de tese
12. data da defesa (se já ocorreu) ou provável defesa (se for o caso)
13. nome e endereço da entidade mantenedora (emprego, bolsa ou ambas, conforme o caso)
14. endereço para correspondência
15. declaração do orientador confirmando os dados da carta, seu nome e assinatura

- X b) carta, declaração ou atestado, assinado pelo Coordenador do curso de pós-graduação, mencionando que o aluno está regularmente matriculado e contendo os seguintes dados:
1. nome do aluno
 2. nome do orientador
 3. título do projeto (tese)
 4. nível (mestrado ou doutoramento)
 5. data da defesa, se esta já ocorreu, ou já prevista.

Nota: a Sociedade Brasileira de Microbiologia se reserva o direito de confirmar a veracidade das informações contidas nas duas cartas citadas nos itens a e b.

- 5.3. Os trabalhos submetidos serão analisados pela Comissão Deliberativa e classificados em primeira triagem.

- 5.4. Durante a realização do Congresso Brasileiro de

Microbiologia, os candidatos estarão sendo novamente julgados, com base na apresentação do trabalho. Na hipótese de qualquer dúvida ou pedido de esclarecimentos por qualquer participante, não será permitida a intervenção do orientador.

- 5.5. Encerrada a segunda fase de julgamento, a Comissão Deliberativa se reunirá, em sessão sigilosa, a fim de decidir por consenso ou sistema que assim por ela for determinado, o trabalho vencedor.
 - 5.6. Os nomes dos premiados serão mantidos sob sigilo, em envelope lacrado, o qual deverá ser entregue ao Presidente da Sociedade Brasileira de Microbiologia, que o levará à Assembléia de Encerramento do Congresso.
 - 5.7. Na Assembléia, a Comissão de Outorga fará a divulgação dos premiados.
 - 5.8. A Secretaria de Normas cuidará das providências seguintes, a saber:
 - a) divulgação pela imprensa e veículo próprio da Sociedade Brasileira de Microbiologia
 - b) entrega do prêmio
 - 5.9. O diploma especialmente preparado, será entregue no ato, assinado pela Comissão de Outorga.
 - 5.10. Os recursos financeiros para a aquisição de literatura serão entregues ao premiado, o qual fará prestação de contas à Sociedade Brasileira de Microbiologia, no prazo máximo de 180 dias, mediante as notas fiscais ou xerocópia de notas fiscais relativas aos artigos adquiridos, contendo:
 - nome do comprador
 - título do item adquirido
 - valor
 - visto do orientador
 - 5.11. Os recursos financeiros destinados à viagem do orientador serão creditados em conta de pou-

6. Cronograma de Execução

1. Distribuição de normas
 2. Apresentação do texto de trabalho completo
 3. Análise e deliberação para a primeira seleção
 4. a) apresentação do trabalho em congresso
b) deliberação final
c) fornecimento de recursos financeiros
d) divulgação dos premiados
 5. Divulgação em geral
 6. Fornecimento de diploma
 7. Fornecimento de Cr\$ para o executor (literatura)
 8. Utilização pelo premiado
 9. Reserva de Cr\$ para orientador
 10. Utilização pelo orientador
 11. Relatórios de viagens
 12. Parecer da comissão de avaliação

pança ou outra especial, com rendimento de juros, em benefício do premiado, a fim de evitar a desvalorização excessiva, até a época da viagem.

- 5.12. O orientador premiado deverá tomar todas as providências visando sua viagem, correndo por sua conta todas as despesas decorrentes.
 - 5.13. Uma vez definido o programa, deverá solicitar à Sociedade Brasileira de Microbiologia que libere os recursos financeiros, através de carta contendo os seguintes elementos:
 - a) local para onde viajará
 - b) nome do(s) profissional(is) com o(s) qual(is) manterá contato
 - c) síntese do programa que desenvolverá e objetivo da viagem, a qual não poderá ser inferior a oito (8) semanas de estágio.
 - 5.14. A carta a que se refere o item 5.13 deverá ser acompanhada de carta ou xerocópia de correspondência da(s) entidade(s) de destino concordando em receber a visita do premiado.
 - 5.15. A Sociedade Brasileira de Microbiologia fará a aquisição da passagem e a fornecerá ao premiado. Mediante justa causa, fará a liberação do numerário equivalente, através de explicação do interessado.
 - 5.16. O restante do dinheiro será liberado mediante a requisição do interessado, com citação do número do passaporte e xerocópia do visto de saída.
 - 5.17. Após o retorno do orientador premiado, este fará relato suscinto sobre as atividades desempenhadas, o qual será apreciado pela Comissão de Avaliação de Resultados, para divulgação.
 - 5.18. O orientador premiado tem o prazo máximo de 10 meses para realizar a viagem, após o anúncio do prêmio. Caso contrário o dinheiro correspondente deverá ser reutilizado em outro prêmio, no Congresso seguinte.

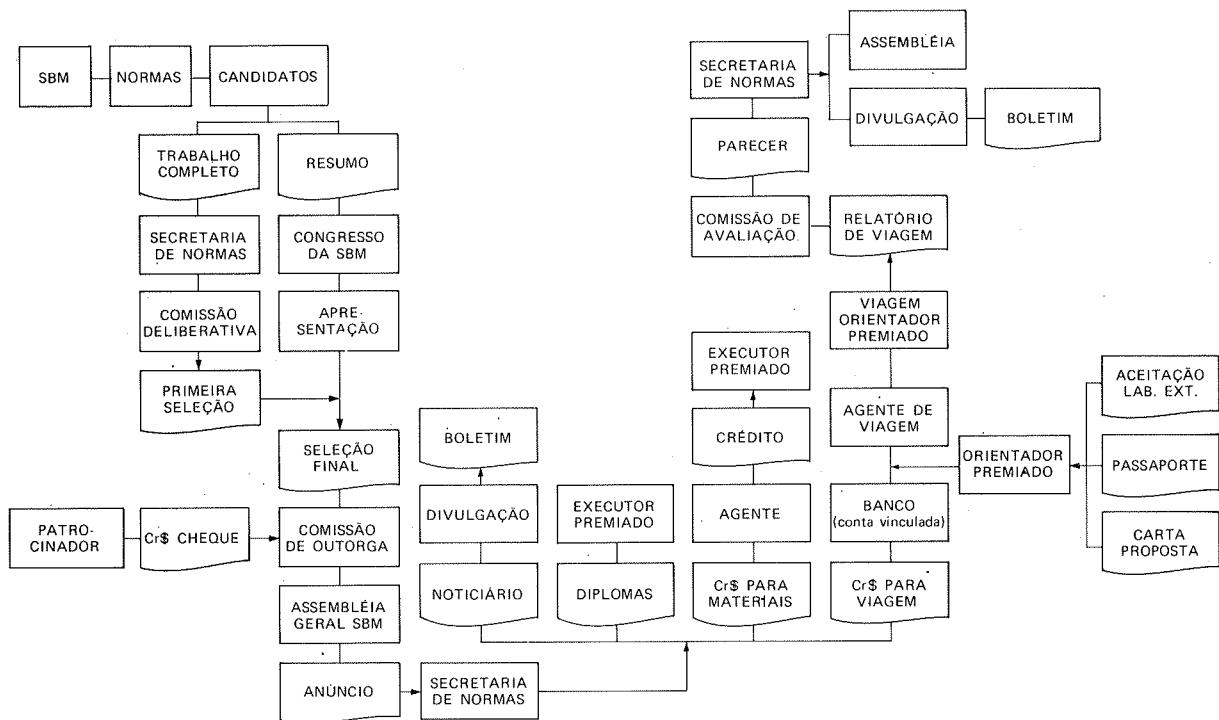
Meses

01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 01 02 03 04 05 06

(30 dias após o regresso do orientador)

(30 dias após o recebimento pela Comissão)

7. Fluxograma



8. Estrutura Organizacional

As atividades destinadas à concessão serão desempenhadas pelas unidades descritas a seguir.

Os integrantes de cada componente serão designados pela Diretoria da Sociedade Brasileira de Microbiologia.

8.1. Secretaria de Normas

Responsável pelo expediente geral e dedicada à disseminação das normas e execução das atividades que culminem com a utilização do prêmio e sua avaliação.

A Secretaria de Normas deverá ser exercida por uma das unidades administrativas da Diretoria da SBM, de acordo com o regime de operação da entidade.

8.2. Comissão Deliberativa

Grupo de especialistas constituído de, no mínimo três (3) e, no máximo quatro (4) profissionais atuantes em distintos setores da microbiologia, ou em setores que permitam o melhor julgamento possível.

A Comissão Deliberativa decide a quem dar o prêmio.

8.3. Comissão de Outorga

Grupo de personalidades, em microbiologia, e da entidade patrocinadora, encarregado da outorga.

8.4. Comissão de Avaliação de Resultados

Grupo de especialistas, no mínimo de dois (2) e no máximo de três (3), encarregado da análise e

produção de parecer sobre o relatório de uso do prêmio pelo orientador.

8.5. Secretaria de Divulgação

Responsável pela produção de informações sobre a concessão do prêmio e sua disseminação.

9. Parâmetros para a Avaliação de Trabalho

A decisão de concessão é da total responsabilidade da Comissão Deliberativa. Todavia, os critérios, discriminados a seguir, deverão ser utilizados, a título de parâmetros. Além desses, a Comissão Deliberativa tem inteira liberdade para adicionar quaisquer outros que julgar convenientes.

Instruções para a Aplicação

1. A avaliação se divide em duas unidades: (i) a Idéia e (ii) o Produto
 2. O número total de pontos é 140 (cento e quarenta), correspondendo ao teto de 100 (cem) para efeito de aplicação de nota, assim distribuídos: (i) Idéia, 100 e (ii) Produto, 40.
 3. A contagem dos pontos é por soma simples, conforme esquema de alocação de valores incluídos na lista de critérios a seguir.
- Para efeito de transformação do número de pontos obtidos em nota, as relações são as seguintes:

nº de pontos	nota auferida	grau
0 a 79,0	insuficiente	E
80,0 a 90,0	70,0 a 75,0	D
91,0 a 105,0	80,0 a 85,0	C
106,0 a 120,0	90,0 a 95,0	B
121,0 a 140,0	95,0 a 100,0	A

Obs. — o avaliador deverá usar de seu julgamento e decisão pessoal quando à tendência das notas de valores intermediários, isto é: se 75,0 está mais para 70,0 do que para 80,0; se 85,0 está mais para 80,0 do que para 90,0; e se 95,0 está mais para 90,0 do que para 100,0. Isto vai por conta do critério de "ponto por conceito".

4. A critério do avaliador, poderá ser aplicado fator de correção, em função do ambiente de ensino e recursos técnico-científicos do candidato, a fim de garantir melhor nível de competição de pessoal de regiões menos desenvolvidas, no que diz respeito ao assunto em avaliação. O seguinte sistema é proposto, mas que pode ser modificado a critério do avaliador:

Grupo A — candidato da entidade possuidora de recursos técnicos-científicos em boas condições. Os valores obtidos, através do sistema de aferição de notas não está sujeito a qualquer correção.

Grupo B — Recursos técnico-científicos inferiores aos encontrados no grupo A. Para este, aplicar correção de 15-20% sobre o número de pontos obtidos e, em seguida, proceder à conversão para as notas.

Grupo C — Recursos técnico-científicos inferiores aos encontrados no grupo B. Para estes, aplicar o fator correção de 25-30% e proceder como indicado acima.

Sistema de Alocação de Pontos

1. **Idéia** — 100 pontos totais

1.1. originalidade — 40 pontos, assim distribuídos:

- i. escolha do material — 16 pontos
- ii. seleção de técnicas — 16 pontos
- iii. plano experimental ou metodológico — 8 pontos

1.2. relevância — 40 pontos, assim distribuídos:

- i. para a área ou disciplina — 22 pontos
- ii. para a biologia — 10 pontos
- iii. para a ciência ou tecnologia em geral — 8 pontos

1.3. criatividade — 10 pontos totais

1.4. complexidade do tema — 10 pontos totais

2. **Produto** — 40 pontos totais

2.1. organização e estrutura geral do texto — 8 pontos

2.2. estilo técnico científico — 8 pontos

2.3. correção gramatical e lucidez explanatória — 8 pontos

2.4. volume de informação — 8 pontos

2.5. natureza da informação — 8 pontos, assim distribuídos:

- i. qualidade da informação — 3 pontos
- ii. complementaridade a outros fatos — 3 pontos
- iii. profundidade — 2 pontos

Comparação antigênica entre *Tritrichomonas suis* e *T. foetus* — III imunoelétroforese (IEF)*

Geraldo A. De Carli** & Jorge Guerrero***

Resumo

Antígenos preparados de *Tritrichomonas suis* e *T. foetus* foram separados pela eletroforese em gel e reagiram com os imuno-soros preparados em coelhos injetados com cada espécie de *Tritrichomonas*. As linhas de precipitação mais numerosas e mais fortes foram obtidas nas reações entre os antígenos e os imuno-soros homólogos. O estudo imunoelétroforético trouxe resultados adicionais ao número de componentes antigênicos, mostrando a presença de pelo menos três grupos antigênicos específicos para a *T. foetus* e um para a *T. suis*. Os resultados obtidos puderam ser associados aos dados obtidos pela imunofluorescência indireta (IFI) e imundifusão em gel (ID).

Summary

Antigenic comparison between Tritrichomonas suis and T. foetus — III Immunolectrophoresis (IEF)

Antigens prepared from *Tritrichomonas suis* and *T. foetus* were separated by gel immunolectrophoresis and reacted with the immune sera prepared from rabbits injected with gross antigens of each species of *Tritrichomonas*. The largest number and strongest precipitating lines were obtained in the reactions between antigens and their homologous immune sera. The immunolectrophoretic study produced additional information about the number of antigenic components showing the presence of at least three specific antigenic groups for *T. foetus* and one for *T. suis*. The results were related to data obtained by indirect immunofluorescence (IFI) and gel immunodiffusion.

Introdução

A comparação antigênica entre *Tritrichomonas suis* e *T. foetus* foi examinada pela imunofluorescência indireta (IFI) (2) e pela imundifusão em gel (ID) (3). Os resultados obtidos indicaram a existência de抗ígenos comuns a ambas espécies com estrutura antigênica relacionada. Na presente investigação foi estudada a relação antigênica entre estes protozoários através da imunoelétroforese (IEF).

Material e Métodos

Duas espécies de *Tritrichomonas* foram usadas neste estudo: *T. suis* (amostra TS-1), isolada da cavidade nasal de porcos domésticos, *Sus scrofa*, por De Carli & Guerrero (1) e *T. foetus* (amostra RJ-1), recebida do Dr. Auvenir de Almeida Ramos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, km 47, Via Campo Grande, Rio de Janeiro.

Os抗ígenos foram preparados, para cada organi-

mo, de acordo como foi previamente descrito (2). A concentração de carboidratos totais, nitrogênio e proteínas existentes nos抗ígenos foi determinada pelo método da antrona de Fales (5) e modificado por Goodchild (6); pela técnica de Kjeldahl de 1833, modificada por Taveira & Bethlem (9) e pelo método de Folin-Ciocalteau, descrito por Lowry (7), respectivamente (2).

Os imuno-soros e o soro normal de coelho (SNC), preparados previamente (2), foram usados neste estudo. A técnica descrita por Williams (10), Rose & Bigazzi (8) e Dwyer (4) foi usada para separar as proteínas na superfície do ágar, de acordo com as cargas, das mesmas pela exposição em um campo elétrico com corrente direta. O agente geleificante foi agar purificado (BBL), na concentração de 1,2% em solução tampão de barbital com pH = 8,6, sem preservativo.

Lâminas de microscopia (128 x 75mm) foram preparadas pela adição de 2,5ml de agar purificado, liqüefato (50-60°C). Após a solidificação do agar à temperatura ambiente (22°C), as lâminas foram estocadas a 5°C em câmara úmida.

* Investigação realizada com o auxílio financeiro da FAPERGS. Projeto Vet. 40/74.

** Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises. UFRGS, Porto Alegre, RS.

***Instituto de Pesquisas Johnson & Jonhson de Doenças Endêmicas, São José dos Campos, SP e Faculdade de Medicina Veterinária, USP, São Paulo. End. Atual: Pitman-Moore, Inc Washington Crossing, NJ 08560 USA.

Antes do uso, a superfície de agar de cada lâmina foi perfurada com a matriz escolhida. As lâminas preparadas, e com os orifícios cheios do antígeno desejado, foram submetidas a eletroforese, durante 90 minutos, usando-se seis miliamperes (mA) por lâmina, a 22°C, em solução tampão de barbital com pH = 8,6 e força iônica 0,005. Terminada a migração, as canaletas das lâminas foram imediatamente cheias com os imunosoros. A reação processou-se em câmara úmida a 5°C; durante 72 horas. Em cada série de experimentos o imuno-soro específico reagiu contra os抗ígenos homólogos e heterólogos. As linhas de precipitação foram coradas e fotografadas, como foi descrito anteriormente (3). Todas as reações foram fotografadas depois de 72 horas de incubação (11).

Resultados e Discussão

Foram obtidos resultados negativos nas reações que envolveram o soro normal de coelho e os dois抗ígenos dos protozoários, ficando demonstrado que os coelhos utilizados não tinham tido anteriormente contato com estes抗ígenos. Não se formaram linhas de precipitação nas reações entre a solução tampão de barbital, os抗ígenos e os seis imuno-soros. A Tabela 1 mostra os resultados das reações de precipitação, obtidas através da IEF entre os imuno-soros e os抗ígenos de *Tritrichomonas*.

Tabela 1

Resultados das reações de precipitação, obtidas através da imunoeflorescência entre anti-soros e抗ígenos de *Tritrichomonas*

Anti-soro	Antígeno	Nº de linhas formadas
ts	TS	1 a 2
	TF	1 a 7
tf	TS	1 a 2
	TF	3 a 6

ts, tf = anti-soros de *T. suis* e *T. foetus*

TS, TF =抗ígenos de *T. suis* e *T. foetus*

O sistema抗ígeno-imuno-soro homólogo da *T. foetus* apresentou três, quatro e seis linhas de precipitação (Fig. 1) e os sistemas抗ígeno-imuno-soro homólogo da *T. suis* mostraram uma e duas linhas (Fig. 2).

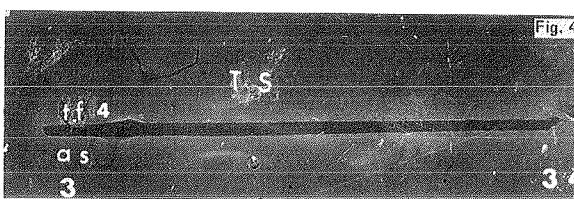
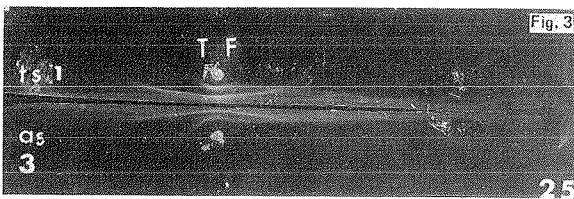
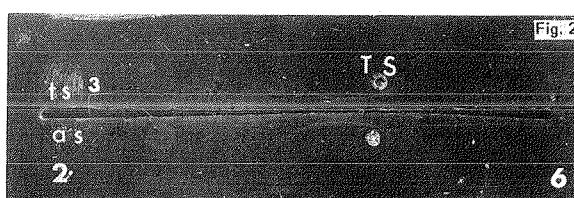
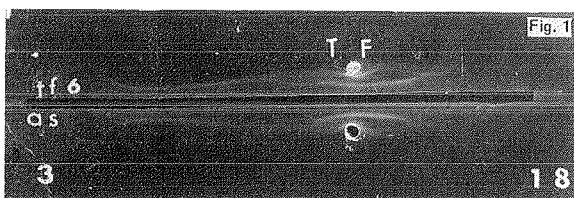
As combinações entre imuno-soro da *T. suis* (ts) e o抗ígeno *T. foetus* (TF) formaram uma, duas e sete linhas (Fig. 3) e o imuno-soro *T. foetus* (tf) e o抗ígeno *T. suis* (TS) revelaram uma e duas linhas de precipitação (Fig. 4).

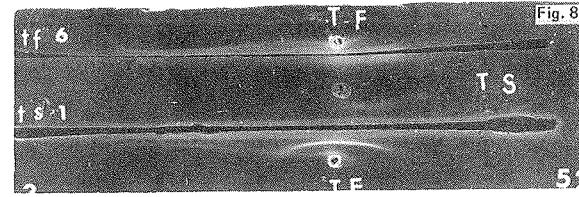
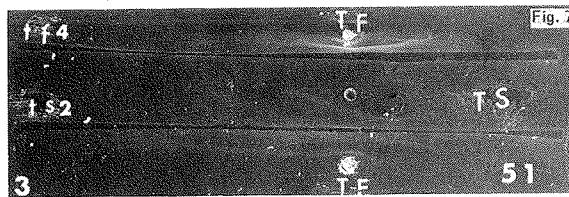
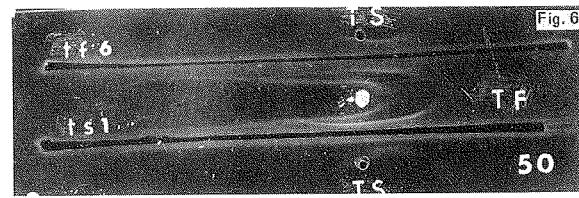
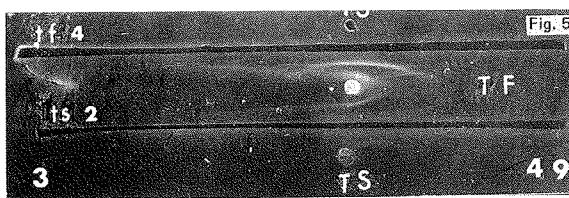
Os resultados previamente obtidos pela imunoeflorescência indireta (IFI) (2) e pelo método da difusão em gel (ID) (3) indicaram que existe relação antigenica muito próxima entre *T. suis* e *T. foetus*. Acrescente-se a isso que a imunoeflorescência indireta trouxe somente informações concernentes à existência de reações cruzadas entre as duas espécies. Entretanto, estes dados indicaram o número de抗ígenos comuns ou relacionados e responsáveis pelas várias reações cruzadas. Por outro lado, os resultados obtidos na imunodifusão em gel indicaram que as tricomonas de origem suína e bovina dividem entre si, no mínimo,抗ígenos idênticos com um número parcialmente relacionado.

Este estudo imunoeflorescético trouxe resultados quantitativos adicionais ao número de componentes antigenicos. Os resultados obtidos pela imunoeflorescência indireta (2) e pela imunodifusão em gel (3) mostraram resultados parcialmente semelhantes, evidenciando que as reações cruzadas entre os dois organismos refletem o número de抗ígenos comuns e relacionados.

Quando os抗ígenos TS e TF (Fig. 5, 6, 7, 8) foram comparados com os seus imuno-soros homólogos e heterólogos, observou-se que *T. foetus* reagiu com *T. suis*, formando quatro linhas de precipitação. Esta reação mostrou que *T. suis* deveria revelar também a presença destes determinantes antigenicos. Contudo, estes fatores poderiam não se encontrar no抗ígeno testado ou não estar em concentração adequada, ou então poderiam ter sido neutralizados durante a preparação ou estavam em quantidades insuficientes para reagir "in vitro".

A presença de anti-corpos contra os determinantes antigenicos de *T. foetus*, demonstrou porém que o抗í-





geno TS injetado nos coelhos possui determinantes antigenicos semelhantes e que estão presentes na reação antígeno-anti-corpo. Entretanto, os resultados da imunodifusão em gel (ID) (3) puderem ser associados aos dados obtidos na imunoeletroforese (IEF), mostrando a formação de linhas de precipitação que indicaram a existência de antígenos comuns ou com uma estrutura relacionada.

T. foetus apresentou pelo menos três determinantes antigenicos que não estão presentes nas preparações antigenicas de *T. suis*.

T. suis apresentou dois determinantes antigenicos no sistema homólogo, com o imuno-soro contra *T. foetus*, uma destas linhas de precipitação também está presente, demonstrando que o coelho injetado com o antígeno TF reconheceu a presença de grupos antigenicos semelhantes àqueles presentes no antígeno TS. Conclui-se que este sistema é comum a *T. suis* e *T. foetus* mas, por motivos já explicados acima, esta reação não se apresentou no sistema TS homólogo.

Deve-se ressaltar que os antígenos responsáveis pela formação de numerosas linhas de precipitação de identidade, nos sistemas antígeno-anti-corpo nos testes de imunoeletroforese, aparentemente possuem, no míni-

mo, estrutura idêntica, como já foi visto nas provas de IFI (2) e ID (3). As linhas de identidade, obtidas na IEF, sugerem que os antígenos das duas espécies possuem estrutura parcialmente relacionada entre si. Entretanto, torna-se evidente que o grau de reações cruzadas entre os dois organismos, observadas pela IFI, ID e IEF, refletem o número comum e relativo de antígenos que eles partilham entre si, mas também indicam a existência de antígenos específicos para cada espécie.

A provável relação antigenica e filogenética comum entre as duas espécies, sugerida com o auxílio da imunofluorescência indireta e pela imunodifusão em gel, foram confirmadas pelos resultados deste estudo.

Agradecimentos

Agradecemos aos professores Edgar Mário Wagner e Elísia da Silva Wagner pelas sugestões e críticas na redação deste trabalho. Agradecemos também às acadêmicas Srtas. Maria Isabel D'Arrigo e Ana Teresa Jacinto. Maia pela assistência na documentação fotográfica e a farmacêutica-bioquímica Zilma Freire e ao técnico de laboratório Sr. Eni Nunes pela preparação dos meios de cultura.

Referências Bibliográficas

- DE CARLI, G.A. & GUERRERO, J. — *Tritrichomonas suis*: Isolamento, morfologia e incidência na cavidade nasal de porcos domésticos *Sus scrofa*. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 22:269-276, 1975.
- DE CARLI, G.A. & GUERRERO, J. — Comparação antigenica entre *Tritrichomonas suis* e *T. foetus*. I — Imunofluorescência indireta (IFI). *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 6:55-58, 1975.
- DE CARLI, G.A. & GUERRERO, J. — Antigenic Comparison between *Tritrichomonas suis* and *T. foetus*. II — Gel Immunodiffusion. *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 18:167-171, 1976.
- DWYER, D.M. — Analysis of the antigenic relationships among *Tritrichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba* and *Entamoeba*. III — Immunoelctrophoresis technics. *J. Protozool.*, 21:139-145, 1974.
- FALES, F.W. — The assimilation and degradation of carbohydrates by cells. *J. Biol. Chem.*, 193:113-124, 1951.
- GOODCHILD, C.C. — Carbohydrate contents of the tape worm *Hymenolepis diminuta* from normal, bileless and starved rats. *J. Parasit.*, 47:401-405, 1961.
- LOWRY, O.H. et alii — Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
- ROSE, N.R. & BIAGAZZI, P.E. — *Methods in immunodiagnosis*. New York, John Wiley & Sons, 1973, 212p.
- TAVEIRA, M. & BETHELM, M.L. — Doseamento de proteínas. In: Id. *Química bromatológica; métodos de análise de alimentos*. Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Brasil, 1957, fasc. 1, p. 75-80, mimeografado.
- WILLIAMS, C.A. — Immunoelctrophoretic analysis in agar gels. In: WILLIAMS, C.A. & CHASE, M.W., ed. *Methods in immunochromatography*. New York, Academic Press, 1971, v. 3, cap. 14, p. 237-273.
- WILLIAMS, C.A. & CHASE, M.W. — Photography of precipitates in gels. In: Id. *Methods in immunology and immunochemistry*. New York, Academic Press, 1971, v. 3, cap. 14, p. 321-339.

Natureza genética da fermentação de lactose em amostras de *Salmonella typhimurium**

Maria Heloiza Trebilcock Affonso,
Maria Regina Fernandes de Toledo & Luiz Rachid Trabulsi

Resumo

Foi estudada, sob o ponto de vista genético, a fermentação de lactose em oito amostras de *Salmonella typhimurium*. Todas as amostras transferiram, por conjugação, o caráter Lac, tendo sido demonstrado que este caráter se deve a um plasmídio autotransferível, uma vez que sua transferência parece independe de outros plasmídios presentes nessas amostras; este plasmídio foi denominado Ms-lac. A freqüência de transferência variou em torno de um valor médio de $1,9 \times 10^{-5}$, o que demonstra ser um plasmídio do tipo auto-reprimido. Ms-lac não foi eliminado por alaranjado de acridina, dodecil sulfato de sódio e brometo de etídio. Foi estudada também a transferência das marcas de resistência para sulfadiazina (Su), estreptomicina (Sm), tetraciclina (T), cloranfenicol (C), canamicina (K) e ampicilina (Ap), apresentadas por essas amostras. As marcas Su, Sm e Ap foram sistematicamente transferidas; estudos de cotransferência e retransferência sugerem que a resistência a essas drogas se deve a dois fatores R autotransferíveis: um, codificando para resistência a Su, Sm e Ap e outro, somente para Ap. As marcas de resistência para T, C e K não foram transferidas de nenhuma das amostras.

Summary

Genetics of lactose fermentation in strains of Salmonella typhimurium

The genetic of lactose fermentation was studied in eight strains of *Salmonella typhimurium*. It was found that these strains were able to transfer the Lac character by conjugation. The element carrying the Lac character could be transferred independently of R factors carried by these strains. This element was designed plasmid Ms-lac. The frequency of Lac transfer ranged from $4,1 \times 10^{-5}$ to $8,3 \times 10^{-7}$. This fact suggests that plasmid Ms-lac is a repressed one. Ms-lac was not "cured" by acridine orange, sodium dodecyl sulfate and ethidium bromide. The transfer of resistance to sulfadiazine (Su), streptomycin (Sm), tetracycline (T), chloramphenicol (C), kanamycin (K) and ampicillin (Ap) was also studied. Resistance to Su, Sm and Ap was transferred in all instances; co-transfer and re-transfer studies suggest that resistance to these drugs is due to two transferable R factors: one, responsible for resistance to Su, Sm and Ap and another, for resistance to Ap, only. The T, C and K markers were not transferred by conjugation.

Introdução

Em 1972, Pessoa (21) demonstrou que uma variante lactose positiva de *Salmonella typhimurium* era endêmica em São Paulo, representando 31,8% das amostras de *Salmonella* isoladas em seu laboratório. Posteriormente, Almeida & Trabulsi (3) e Falcão & col. (8) reportaram freqüência semelhante, determinando várias características das amostras por eles isoladas. Em 1974, Affonso & col. (2) e Le Minor & col. (15), independentemente, verificaram que o caráter Lac, nas amostras de *Salmonella*, era transferível por conjugação. Entretanto, enquanto os primeiros autores demonstraram que a transferência se fazia de maneira autônoma, os últimos só conseguiram por meio de mobilização do caráter

Lac, por um fator sexual.

No presente trabalho, são apresentados os resultados de nossos estudos sobre a transferência do caráter Lac, em várias amostras, bem como algumas características do plasmídio responsável por este caráter.

Material e Métodos

Amostras — Amostras de *Salmonella typhimurium*, variedade Copenhagen, lactose positiva (*Salmonella* Lac⁺), foram isoladas no Instituto de Gastroenterologia de São Paulo. A maioria apresentava resistência para sulfadiazina (Su), estreptomicina (Sm), tetraciclina (T), cloranfenicol (C), canamicina (K), ácido nalidíxico (AN) e ampicilina (Ap). Mutantes derivados de *E. coli* K12,

* Parte da tese de Mestrado de Maria Heloiza Trebilcock Affonso, bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), realizada com auxílio do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Disciplina de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina, R. Botucatu, 862, 3º andar, 04023 — São Paulo, SP.

cujas características e procedência são apresentadas na Tabela 1, foram utilizados como receptoras, em experimentos de conjugação. Os mutantes resistentes a drogas foram obtidos pelo método de Szybalski & Bryson (30).

Determinação dos níveis de resistência — O método empregado foi o de diluição em placa (34). Como meio de cultura, foi utilizado o meio mínimo (5), acrescido de lactose. O nível de resistência foi determinado para as seguintes drogas: sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, canamicina, ácido nalidíxico, ampicilina, rifampicina, cefalotina, polimixina e gentamicina.

Obtenção de mutantes auxotróficos das amostras de *Salmonella Lac⁺* — As amostras, crescidas em BHI ("Brain Heart Infusion Broth" — Oxoid ou Difco), foram diluídas 1/100 no mesmo meio e reincubadas por 2 horas. Após esse período, foram lavadas duas vezes com tampão tris-maleato pH 6,0 e, a seguir, tratadas com solução de nitrosoguanidina (K&K Laboratories, Inc.), na concentração de 1mg/ml. Após 15 minutos de incubação a 37°C com agitação constante, as culturas foram lavadas duas vezes no mesmo tampão, diluídas e plaqueadas em agar Mac Conkey ("Mac Conkey Agar" — Oxoid ou Difco). Foram obtidos mutantes auxotróficos de oito amostras de *Salmonella Lac⁺*, os quais foram utilizados nos experimentos de transferência.

Atividade colicinogênica — Foi utilizado o método de abbott & Shannon (1), conforme descrito por Zuliani (38), evidenciando-se que nenhuma das amostras de *Salmonella Lac⁺* produziu colicinas ativas contra as amostras de K12.

Experimentos de conjugação — Foi empregado, basicamente, o método descrito por Watanabe (35), com algumas modificações. Nos experimentos de transferência do caráter Lac, a mistura de doadora e receptora foi concentrada três vezes. Os cálculos das freqüências de transferência de Lac e resistência a drogas foram feitos segundo a relação número de células recombinantes/número de células doadoras. Os meios seletores empregados foram o meio mínimo, acrescido de lactose e o meio mínimo acrescido de glicose e drogas, nas concentrações de 500µg/ml para sulfadiazina e ampicilina; 20µg/ml para cloranfenicol e canamicina e 10µg/ml para estreptomicina e tetraciclina. As placas seletoras, contendo drogas, foram incubadas por 48 horas; aquelas contendo lactose, por um período de até seis dias.

Cotransferência — Foi empregado o método de "replica plating" (14). Os meios utilizados foram o meio mínimo acrescido de lactose, agar Mac Conkey e meio mínimo acrescido de glicose e drogas, nas mesmas concentrações utilizadas nas placas seletoras.

Eliminação do caráter Lac — Foram utilizadas três drogas, comumente empregadas na eliminação de plasmí-

dios: alaranjado de acridina (Nutritional Biochemicals) (10), dodecil sulfato de sódio (Sigma) (11, 26, 33) e brometo de etídio (Gallard Schlesinger) (4, 32). As concentrações utilizadas para o alaranjado de acridina, dodecil sulfato de sódio e brometo de etídio foram respectivamente, 60µg/ml, 100mg/ml e 78,9µg/ml. As condições de cada experimento, bem como as concentrações das drogas, foram padronizadas, de modo a se obter a máxima porcentagem possível de eliminação do plasmídeo F'lac, na amostra controle K12 RV/F'lac.

Resultados

Transferência dos caracteres Lac e resistência a drogas

— As primeiras tentativas de transferência, por conjugação, dos caracteres Lac e resistência a drogas utilizando-se, como receptora, a amostra K12 RV Lac-Rif^R, resistente a 1000µg/ml de rifampicina (Tabela 1), evidenciaram dois aspectos interessantes:

- não havia crescimento de recombinantes Lac⁺, nas placas destinadas a seu isolamento (meio mínimo, acrescido de lactose e rifampicina), embora recombinantes resistentes a drogas, crescessem abundantemente nas placas apropriadas (meio mínimo, acrescido de glicose, rifampicina e drogas);
- das marcas de resistência, somente sulfadiazina(Su), estreptomicina (Sm) e ampicilina (Ap) podiam ser transferidas, isto acontecendo de maneira sistemática.

Numerosos experimentos repetiram os mesmos resultados. Dada a impossibilidade de transferir o caráter Lac, procurou-se outro sistema para a seleção de recombinantes.

Utilização de mutantes auxotróficos — Os estudos de transferência foram feitos a partir de mutantes auxotróficos obtidos das amostras de *Salmonella Lac⁺* nº 1, 4, 5, 7, 8, 9, 11 e 12. A receptora, em todos os experimentos, foi a amostra RV Lac⁻ (Tabela 1). Nos experimentos com as amostras nºs 1 e 9, utilizou-se também, como receptora, *E. coli* KL110, mutante recA (Tabela 1). As amostras de *Salmonella* nºs 1 e 9 não cresciham no meio mínimo adicionado dos aminoácidos necessários ao crescimento de *E. coli* KL110.

Com a amostra receptora RV Lac⁻, o meio seletor empregado para a transferência de Lac foi o meio mínimo contendo lactose e, para a transferência de resistência a drogas, o meio mínimo, acrescido de glicose e das drogas indicadas. Inicialmente, foram utilizadas todas as drogas contra as quais as amostras doadoras eram resistentes. Entretanto, foram obtidos os mesmos resultados dos experimentos preliminares, isto é, somente transferência das marcas Su, Sm e Ap. Por esta razão, não foram utilizadas placas contendo as demais drogas, em experimentos subsequentes.

Para a transferência de Lac para *E. coli* KL110, as pla-

cas seletoras foram preparadas com meio mínimo contendo lactose, acrescido de histidina, timina, arginina, metionina e leucina, devido à auxotrofia da amostra receptora.

As oito amostras investigadas foram capazes de

Tabela 1
Amostras de *Escherichia coli* K12

Amostras	Características genotípicas	Procedência
RV/F' lac	F' lac/Δ lac x74	Dr. Werner K. Maas*
RV Lac ⁻	F- Δ lac x74	Derivada de RV/F' lac (29)
RV Lac ⁻ AN ^R	F- Δ lac x74 Nal ^R	Derivada de RV Lac ⁻ (29)
RV Lac ⁻ Rif ^R	F- Δ lac x74 Rif ^R	Mutante por nós obtido a partir de RV Lac ⁻
KL 110 Gal ⁺	F- his thy leu metB argG lacY strA recA	Dr. Werner K. Maas*
3828 Lac ⁻ AN ^R	F- his lac Str ^R Nal ^R	Mutante por nós obtido a partir de 3828 Lac ⁻

Notação: F-, bactéria não portadora de fator sexual; F' lac, fator sexual F contendo o operon da lactose; Gal⁺, fermentação de galactose; his, histidina; thy, timina; leu, leucina; met, metionina; arg, arginina — necessidades nutritivas; str e Str^R, resistência à streptomicina; Nal^R e AN^R, resistência ao ácido nalidíxico; Rif^R, resistência à rifampicina; Δ lac x74, deleção no operon da lactose; lac, Lac⁻, incapacidade de fermentar a lactose; recA, mutação no locus recA

* New York University Medical Center, School of Medicine, Department of Microbiology

Tabela 2
Frequência de transferência dos caracteres Lac e resistência a drogas de 8 amostras de *Salmonella* Lac⁺, para *E. coli* K12 RV Lac⁻

Amostras doadoras	Frequência de transferência		
	Lac	Sm	Ap
1	4,1 x 10 ⁻⁵	2,6 x 10 ⁻⁴	2,2 x 10 ⁻⁴
4	3,4 x 10 ⁻⁵	1,5 x 10 ⁻⁴	2,9 x 10 ⁻⁴
5	8,1 x 10 ⁻⁶	2,0 x 10 ⁻⁴	1,8 x 10 ⁻⁴
7	1,7 x 10 ⁻⁵	6,3 x 10 ⁻⁵	5,4 x 10 ⁻⁵
8	4,6 x 10 ⁻⁶	5,1 x 10 ⁻⁵	5,3 x 10 ⁻⁵
9	3,9 x 10 ⁻⁵	2,2 x 10 ⁻⁴	1,2 x 10 ⁻⁴
11	8,3 x 10 ⁻⁷	6,7 x 10 ⁻⁵	1,2 x 10 ⁻⁴
12	1,3 x 10 ⁻⁶	4,0 x 10 ⁻⁵	2,7 x 10 ⁻⁵

Lac = fermentação de lactose

Sm = estreptomicina

Ap = ampicilina

transferir, para RV Lac⁻, os quatro caracteres investigados, ou seja, Lac, Su, Sm e Ap. A frequência de transferência de Lac variou entre $4,1 \times 10^{-5}$ e $8,3 \times 10^{-7}$; a de Sm, entre $2,6 \times 10^{-4}$ e $4,0 \times 10^{-5}$; e a de Ap, entre $2,2 \times 10^{-4}$ e $2,7 \times 10^{-5}$ (Tabela 2). A frequência de transferência de Su não pôde ser calculada com precisão, devido ao crescimento bacteriano confluinte, nas placas seletoras, na maioria dos experimentos. Nos experimentos de conjugação com *E. coli* KL110, verificou-se que as amostras de *Salmonella* n°s 1 e 9 foram capazes de transferir o caráter Lac.

Cotransferência de Lac, Su, Sm e Ap — Quando a seleção dos recombinantes foi feita por meio de lactose (Tabela 3), o caráter Lac se segregou dos de resistência a drogas, nos experimentos com as amostras de *Salmonella* n°s 1, 4 e 5. Quando a seleção foi feita através de drogas, a segregação ocorreu nos experimentos com todas as amostras de *Salmonella*. Os recombinantes resistentes a drogas não apresentaram o caráter Lac, com uma única exceção (amostra n° 9). Com relação aos caracteres de resistência a drogas, o único a seregar dos demais foi o caráter Ap. (amostra n° 4).

Retransferência dos caracteres Lac, Su, Sm e Ap — Foram submetidos à conjugação, 16 recombinantes provenientes dos experimentos com as amostras de *Salmonella* os quais apresentavam os seguintes modelos: Lac, LacAp, LacSuSmAp, SuSmAp e Ap; o número dos recombinantes estudados de cada modelo foi, respectivamente, 4, 1, 5, 5 e 1. Nos experimentos com os recombinantes Lac, foram utilizadas, como receptoras, duas amostras de *E. coli* K12: RV Lac⁻ AN^R e 3828 Lac⁻ AN^R (Tabela 1); com os demais recombinantes, foi utilizada somente a primeira receptora.

Os resultados dos experimentos mostram que: (a) os quatro recombinantes Lac transferiram o caráter, sendo que três deles somente para a receptora 3828. A frequência de transferência, do único recombinante Lac que transferiu o caráter para a receptora RV, foi de $6,5 \times 10^{-6}$ (Tabela 4); (b) os recombinantes LacAp e LacSuSmAp transferiram, regularmente, seus caracteres, sendo que as frequências de transferência do caráter variaram entre $8,1 \times 10^{-5}$ e $1,2 \times 10^{-6}$ (Tabela 4); (c) quanto aos recombinantes SuSmAp e Ap, ocorreu transferência regular de seus caracteres.

Os resultados gerais dos experimentos de retransfereência (Tabela 4) e os de cotransferência (Tabela 5) revelam que, com exceção dos recombinantes n°s 6 e 14, ocorreu segregação das marcas transferidas pelos demais. Com o recombinante n° 12, os modelos obtidos foram LacSuSmAp e LacAp, aliás idênticos a dois, dos três selecionados na placa de lactose, nos experimentos de conjugação com a *Salmonella* n° 4 (Tabela 3), que deu origem ao recombinante n° 12. Os demais recombinantes LacSuSmAp deram origem a segregantes do tipo Lac e LacSuSmAp.

Tabela 3

Freqüência de cotransferência dos caracteres Lac e resistência a Su, Sm e Ap, nos recombinantes *E. coli* K12 RV

Amostras doadoras	Placa seletora	Recombinantes K12 RV		
		Modelos	% do modelo	% de cotransferência
1	lac	Lac	9,5	90,5
		LacSuSmAp	90,5	
	Su	SuSmAp	100	0,0
	Sm	SuSmAp	100	0,0
4	Ap	SuSmAp	100	0,0
	lac	Lac	2,0	
		LacAp	62,0	98,0
		LacSuSmAp	36,0	
5	Su	SuSmAp	100	0,0
	Sm	SuSmAp	100	0,0
	Ap	Ap	6,7	0,0
		SuSmAp	93,3	
7	lac	Lac	69,2	30,8
		LacSuSmAp	30,8	
	Su	SuSmAp	100	0,0
8	lac	LacSuSmAp	100	100
	Su	SuSmAp	100	0,0
	Sm	SuSmAp	100	0,0
	Ap	SuSmAp	100	0,0
9	lac	LacSuSmAp	100	100
	Su	SuSmAp	100	0,0
	Sm	LacSuSmAp	2,0	2,0
	Ap	SuSmAp	98,0	
11	lac	SuSmAp	100	0,0
	Sm	SuSmAp	100	0,0
	Ap	SuSmAp	100	0,0
12	lac	LacSuSmAp	100	100
	Su	SuSmAp	100	0,0
	Sm	SuSmAp	100	0,0
	Ap	SuAmAp	100	0,0

Su = sulfadiazina
Sm = estreptomicina
Ap = ampicilina
Lac = fermentação de lactose

Ainda com relação à segregação dos caracteres, foi verificado, em diversos recombinantes, que ocorreu segregação após manutenção em estoque, sendo os modelos os mesmos observados quando dos estudos de cotransferência.

Tabela 4

Freqüência de retransferência do caráter Lac, de recombinantes *E. coli* K12 RV, para *E. coli* K12 RV Lac- ANR

Amostras doadoras originais de <i>Salmonella</i> Lac+	Recombinantes K12 RV		Freqüência de retransferência de Lac
	Nº*	Modelos	
1	6	LacSuSmAp	$1,2 \times 10^{-6}$
4	12	LacSuSmAp	$8,3 \times 10^{-6}$
	14	LacAp	$2,0 \times 10^{-5}$
5	21	Lac	$6,5 \times 10^{-6}$
	20	LacSuSmAp	$8,1 \times 10^{-5}$
7	55	LacSuSmAp	$3,8 \times 10^{-6}$
11	43	LacSuSmAp	$2,5 \times 10^{-5}$

Lac = fermentação de lactose

Su = sulfadiazina

Sm = estreptomicina

Ap = ampicilina

Tabela 5

Freqüência de cotransferência dos caracteres Lac e resistência a Su, Sm e Ap, nos recombinantes Lac+, obtidos nos experimentos de retransferência

Amostras doadoras originais de <i>Salmonella</i> Lac+	Recombinantes K12 RV Lac+			% de cotransferência
	Nº*	Modelos originais	Modelos obtidos	
1	6	LacSuSmAp	LacSuSmAp	100
	12	LacSuSmAp	LacSuSmAp	5,6
			LacAp	94,4
4	14	LacAp	LacAp	100
5	20	LacSuSmAp	Lac	69,4
			LacSuSmAp	30,6
7	55	LacSuSmAp	Lac	66,4
			LacSuSmAp	33,6
11	43	LacSuSmAp	Lac	58,1
			LacSuSmAp	41,9

Lac = fermentação de lactose

Su = sulfadiazina

Sm = estreptomicina

Ap = ampicilina

Eliminação com alaranjado de acridina, dodecil sulfato de sódio e brometo de etídio — Quando se compara a freqüência de perda espontânea do caráter Lac, com a freqüência de perda após tratamento das amostras de *Salmonella* com alaranjado de acridina, dodecil sulfato de sódio e brometo de etídio, verifica-se que não houve diferenças significantes, que sugerissem um efeito das substâncias utilizadas na eliminação do caráter (Tabela 6). Para verificar se estes resultados dependiam do hospedeiro, foram tratadas, com alaranjado de acridina,

Tabela 6

Eliminação do caráter Lac com alaranjado de acridina, dodecil sulfato de sódio e brometo de etídeo, em amostras de *Salmonella* Lac⁺

Amostras de <i>Salmonella</i> Lac ⁺	% de eliminação					
	A.O.		S.D.S.		B.E.	
	-	+	-	+	-	+
1	0,0	7,7	4,1	2,8	8,5	6,4
2	0,5	0,0	15,3	29,8	2,3	4,9
4	0,0	1,3	3,7	4,9	3,7	5,1
5	14,8	5,5	9,2	8,5	0,3	3,4
7	0,4	0,2	2,4	1,6	0,8	0,5
<i>E. coli</i> K12 RV/F'lac	0,3	91,0	3,9	96,7	1,4	87,3

A.O. = alaranjado de acridina

S.D.S. = dodecil sulfato de sódio

B.E. = brometo de etídeo

- = amostra não tratada

+ = amostra tratada

Tabela 7

Eliminação do caráter Lac, com alaranjado de acridina, nos recombinantes K12 RV

K12 RV	% de eliminação de Lac	
	Controle	A.O.
Lac (S + 1)	< 1	< 1
Lac (S + 4)	< 1	< 1
Lac (S + 5)	< 1	< 1
Lac (S + 7)	< 1	< 1
Lac (S + 9)	< 1	< 1
Lac (S + 11)	< 1	< 1
Lac (S + 12)	1,9	6,5
F'lac	< 1	98,9

A.O. = alaranjado de acridina

Lac (S + 1, 4, 5, ...) = caráter Lac proveniente das amostras de *Salmonella* Lac⁺ n^os 1, 4, 5 ...

várias amostras de *E. coli* K12 que obtiveram o caráter Lac, por conjugação com as amostras de *Salmonella*. Efetivamente, não houve eliminação do caráter Lac (Tabela 7), embora o mesmo tratamento, efetuado em uma amostra de *E. coli* K12, transportando o plasmídio F'lac, eliminasse este fator de 98,9% das células.

Discussão

A demonstração de que as oito amostras de *Salmonella typhimurium* investigadas são capazes de transferir o caráter Lac, por conjugação, para uma amostra de *E. coli* K12 sugere que este caráter é transportado por um elemento extracromossômico. A freqüência de transfe-

rência do caráter é compatível com esta possibilidade e o fato de uma amostra de *E. coli* K12 recA ser receptora e hospedeira adequada do caráter Lac, praticamente confirma sua natureza extracromossômica (16, 20).

Os resultados de cotransferência estabelecem que o plasmídio transportador dos genes responsáveis pelo caráter Lac é independente do fator ou fatores R, presentes nas oito amostras investigadas. Conforme vimos, quando a seleção foi feita pela lactose, foram observados, com bastante freqüência, segregantes apresentando somente o caráter Lac e recombinantes apresentando, simultaneamente, o caráter Lac e as marcas de resistência a drogas. Este fenômeno foi observado tanto na transferência a partir de culturas de *Salmonella*, como a partir de amostras recombinantes de *E. coli* K12. Evidência mais marcante da independência entre os dois tipos de plasmídios é fornecida pelo estudo dos recombinantes selecionados por sulfadiazina, estreptomicina e ampicilina. Com uma única exceção, estes recombinantes foram sistematicamente destituídos do caráter Lac.

Não obstante a independência postulada, poder-seia pensar que a transferência do caráter Lac estaria sendo promovida pelo fator R ou, vice-versa, o fator transportador dos genes lac estaria promovendo a transferência dos genes de resistência. Os resultados de retransferência com os recombinantes de *E. coli* K12 sugerem, entretanto, que isto não ocorre. Tanto os recombinantes Lac, como SuSmAp e Ap transferem estas marcas espontaneamente para outra amostra de *E. coli* K12, sugerindo a presença, nas amostras de *Salmonella* Lac⁺, de pelo menos três plasmídios autônomos quanto à capacidade de transferência e, naturalmente, quanto aos caracteres transportados. Apesar de aceitável, do ponto de vista genético, esta hipótese não exclui totalmente, a possibilidade das amostras de *Salmonella* transportarem outros fatores sexuais, não detectáveis, que poderiam estar promovendo a transferência de cada um dos plasmídios. Este fato pode ser comprovado geneticamente, mas a melhor maneira de elucidar o problema será complementar os estudos realizados, com estudos físico-químicos, para se estabelecer o número de plasmídios presentes nas amostras de *Salmonella* e, particularmente, nos recombinantes de *E. coli* K12.

A possibilidade da transferência do caráter Lac ser mediada por um fator Col é bastante remota, devido à ausência de atividade colicinogênica nas amostras de *Salmonella*. Obviamente, haveria a possibilidade das amostras produzirem colicinas ativas contra outras bactérias, que não as amostras de K12 utilizadas.

É proposto, para o plasmídio transportador dos genes para a fermentação de lactose, nestas amostras de *Salmonella*, a designação Ms-lac (M, de metabólico; s, de *Salmonella* e lac, de fermentação de lactose).

Os resultados observados permitem vários comentários sobre o plasmídio Ms-lac. Em primeiro lugar, trata-

se de um plasmídio auto-reprimido, uma vez que sua freqüência de transferência (entre $4,1 \times 10^{-5}$ e $8,3 \times 10^{-7}$) é relativamente baixa. Isto significa que, como a maioria dos fatores sexuais, o plasmídio Ms-lac possui determinantes para a síntese de um repressor de sua própria fertilidade (7, 18, 19). Neste particular, o plasmídio Ms-lac parece ser diferente dos descritos por Easterling & col. (6), em amostras de *Salmonella*; a diferença entre as freqüências de transferência destes plasmídios (entre 3×10^{-2} e 10^{-4}) e as de Ms-lac, dificilmente poderia ser explicada pelos métodos empregados nos experimentos de conjugação. Quanto ao plasmídio M.IP 234, encontrado em amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas em São Paulo, descrito por Le Minor & col. (15), nada se poderia concluir no momento. De acordo com os autores, o plasmídio M.IP 234 não é autotransferível, enquanto que Ms-lac o é, sem qualquer dúvida.

Outra característica do plasmídio Ms-lac diz respeito à sua provável interferência com a resistência à rifampicina. Não foram detectados recombinantes lactose positivos quando se utilizou, como receptor, um mutante resistente a $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ de rifampicina, selecionando em placas contendo a droga e lactose. O mesmo mutante, paradoxalmente, comportou-se como receptor adequado para os fatores de resistência. Com base em dados citados na literatura (12, 13, 24, 25), duas hipóteses poderiam explicar a interferência do plasmídio Ms-lac com resistência à rifampicina. A primeira seria simplesmente a capacidade de Ms-lac tornar as células receptoras sensíveis à rifampicina. Esta hipótese já foi comprovada com certos fatores R que, quando transferidos para mutantes de *E. coli* K12 resistentes à rifampicina, fazem com que haja acentuada redução do nível de resistência para a droga (25, 28), provavelmente como decorrência do aumento da permeabilidade celular para a rifampicina (24, 25). A outra hipótese seria a eliminação de Ms-lac pela droga, pois se sabe que a rifampicina é capaz de eliminar certos plasmídios por combinar-se, de maneira irreversível, com suas RNA-polimerases (12, 13, 23). Os efeitos de Ms-lac em mutantes resistentes à rifampicina estão sendo investigados.

A não eliminação de Ms-lac pelo alaranjado de acridina, dodecil sulfato de sódio e brometo de etídio, em particular pela primeira substância, representa outra propriedade que o aproxima dos fatores R, uma vez que, não obstante muitos trabalhos (17, 36), a tendência atual é aceitar que os fatores R não sejam eliminados pela acridina (26), em contraste com o fator F, eliminado praticamente, em 100% das células (10). Entretanto, como Toledo & col. (31) demonstraram que um fator F'lac é facilmente eliminado de *E. coli* e *Shigella*, não o sendo de *Salmonella* e *Proteus*, haveria a possibilidade do fator Ms-lac não ter sido eliminado das amostras de *Salmonella*, em consequência de influência do hospedeiro. Os resultados apresentados na Tabela 7, contudo, demonstram não ser este o caso. Realmente, a introdução de vários fatores Ms-lac, em *E. coli* K12, em nada alterou o efeito de eliminação pela acridina, embora um fator F'lac, introduzido na mesma bactéria, fosse eliminado de mais de 90% das células.

Este conjunto de propriedades e o fato de ser auto-reprimido, sugere que o fator Ms-lac se aproxima mais dos fatores R do que do fator F ou fatores F-primos.

Considerada em conjunto, a estrutura genética das amostras de *Salmonella* Lac⁺ é extremamente complexa. Além de Ms-lac, outros estudos mostram que estas amostras transportam pelo menos dois fatores R autotransferíveis, um codificando para resistência a sulfadiazina, estreptomicina e ampicilina e outro, somente, para ampicilina. A presença dos dois tipos de fatores R pode ser demonstrada por segregação, em experimentos de transferência; níveis de resistência à ampicilina de recombinantes portadores de um só ou dos dois fatores; e pela quantidade de -lactamase produzida.

Em adição ao fator Ms-lac e aos dois fatores R, é provável que ainda exista, nestas amostras, um plasmídio que explique a resistência a tetraciclina, cloranfenicol e canamicina. É difícil aceitar que a resistência a três drogas simultaneamente, seja de natureza cromossômica (9, 22, 27, 29, 37). Seria mais provável pensar na presença de, por exemplo, um plasmídio termo-sensível, não transferível nas condições experimentais utilizadas.

Referências Bibliográficas

- ABBOTT, J.D. & SHANNON, R. — A method for typing *Shigella sonnei*, using colicins production as a marker. *J. Clin. Path.*, 11:71-77, 1958.
- AFFONSO, M.H.T.; TRABULSI, L.R. & TOLEDO, M.R.F. — Natureza genética de fermentação de lactose em amostras de *Salmonella typhimurium*. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, V, Rio de Janeiro, 1974. *Resumo dos trabalhos*. Rio de Janeiro, Universidade Gama Filho, 1974. p. 96-97.
- ALMEIDA, P.C.A. & TRABULSI, L.R. — Características culturais, bioquímicas, sorológicas e virulência de amostras de *Salmonella typhimurium* fermentadoras de lactose. *Rev. Microbiol.*, 5:27-35, 1975.
- BOUANCHAUD, D.H.; SCAVIZZI, M.R. & CHABBERT, Y.A. — Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in Enterobacteria and Staphylococci. *J. Gen. Microbiol.*, 54:417-425, 1969.

5. CLOWES, R.C. & HAYES, W. — *Experiments in microbial genetics*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1968. p. 184-185 (Appendix A₄₋₇).
6. EASTERLING, S.B.; JOHNSON, E.M.; WOHLHINTER, J.A. & BARON, L.S. — Nature of lactose-fermenting *Salmonella* strains obtained from clinical sources. *J. Bacteriol.*, 100:35-41, 1969.
7. EGAWA, R. & HIROTA, Y. — Inhibition of fertility by multiple drug-resistance factor (R) in *Escherichia coli* K12. *Jap. J. Genet.*, 37:66-69, 1962.
8. FÁLCÃO, D.P.; TRABULSI, L.R.; HICKMAN, F.W. & FARMER III, J.J. — Unusual Enterobacteriaceae: lactose positive *Salmonella typhimurium* which is endemic in São Paulo, Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, 2:349-353, 1975.
9. FERNANDES, M.R.F. & TRABULSI, L.R. — Resistência infeciosa a drogas em bactérias. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*, 23:153-160, 1968.
10. HIROTA, Y. — The effect of acridine dyes on mating type factors in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 46:57-64, 1960.
11. INUZUKA, N.; NAKAMURA, S.; INUZUKA, M. & TOMOEDA, M. — Specific action of sodium dodecyl sulfate on the sex factor of *Escherichia coli* K-12 Hfr strains. *J. Bacteriol.*, 100:827-835, 1969.
12. JOHNSTON, J.H. & RICHMOND, M.H. — The increased rate of loss of penicillinase plasmids from *S. aureus* in the presence of rifampicin. *J. Gen. Microbiol.*, 60:137-139, 1970.
13. KRCMÉRY, V. & JANOUSKOVA, J. — Effect of rifampicin on stability and transfer of R-factors. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 11:97-101, 1971.
14. LEDERBERG, J. & LEDERBERG, E.M. — Replica-plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.*, 63:399-406, 1952.
15. LE MINOR, L.; COYNAULT, C. & PESSOA, G. — Déterminisme plasmidique du caractère atypique "lactose positif" de souches de *S. typhimurium* et de *S. oranienburg* isolées au Brésil lors d'épidémies de 1971 à 1973. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 125:261-285, 1974.
16. LOW, K.B. — Formation of merodiploids in matings with a class of *rec*^r recipient strains of *Escherichia coli* K12. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 60:160-167, 1968.
17. MITSUHASHI, S.; HARADA, K. & KAMEDA, M. — Elimination of transmissible drug resistance by treatment with acriflavin. *Nature (London)*, 139:947, 1961.
18. MONK, M. & CLOWES, R.C. — Transfer of the colicin I factor in *Escherichia coli* K12 and its interaction with the F fertility factor. *J. Gen. Microbiol.*, 36:365-384, 1964.
19. NISHIMURA, Y.; ISHIBASHI, M.; MEYNELL, E. & HIROTA, Y. — Specific pilation directed by a fertility factor and a resistance factor of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 49:89-98, 1967.
20. NOVICK, R.P. — Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 33:210-235, 1969.
21. PESSOA, G.V.A. — Sobre a ocorrência de uma variante de *Salmonella typhimurium* fermentadora de lactose. São Paulo, 1972 / Tese — Doutoramento — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo /
22. REIS, M.H.L. — Distribuição e natureza genética da resistência ao mercúrio em enterobactérias. São Paulo, 1974 Tese — Mestrado — Escola Paulista de Medicina
23. RIVA, S.; FIETTA, A.; BERTI, M.; SILVESTRI, L.G. & ROMERO, E. — Relationships between curing of the F episome by rifampicin and by acridine orange in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Ag. Chemotherap.*, 3:456-462, 1973.
24. RIVA, S.; FIETTA, A.M. & SILVESTRI, L.G. — R factors determined changes in permeability of *E. coli* towards rifampicin and other antibiotics. In: KRCMÉRY, L.; ROSIVAL, L. & WATANABE, T., eds. *Bacterial plasmids and antibiotic resistance*. Berlin, Springer-Verlag, 1972. p. 343-348.
25. ROMERO, E.; RIVA, S.; FIETTA, A.M. & SILVESTRI, L.G. — Effect of R factors on rifampicin resistance in *E. coli*. *Nature N. Biol.*, 234:56-58, 1971.
26. SALISBURY, V.; HEDGES, R.W. & DATTA, N. — Two modes of "curing" transmissible bacterial plasmids. *J. Gen. Microbiol.*, 70:443-452, 1972.
27. SANTOS, D.S. — Resistência transmissível a drogas na família Enterobacteriaceae. São Paulo, 1972 . Tese — Mestrado — Escola Paulista de Medicina.
28. SCOTTI, R.; SILVESTRI, L.G. & ROMERO, E. — Distribution in nature of R factors that increase susceptibility to rifampicin of rif^r mutants in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 6:121-123, 1974.
29. SILVA, M.L.M. — Resistência a drogas mediada por fatores R não autotransferíveis em amostras de *Shigella flexneri*. São Paulo, 1974 . Tese — Mestrado — Escola Paulista de Medicina
30. SZYBALSKI, W. & BRYSON, V. — Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. *J. Bacteriol.*, 64:489-499, 1952.
31. TOLEDO, M.R.F.; SILVA, R.M.; ALMEIDA, R.G. & TRABULSI, L.R. — The influence of the host in the curing of a F'lac factor by acridine orange.
32. TOMCHICK, R. & MANDEL, H.G. — Biochemical effects of ethidium bromide in micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.*, 36:225-236, 1964.
33. TOMÓEDA, M.; INUZUKA, M.; KUBO, N. & NAKAMURA, S. — Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate. *J. Bacteriol.*, 95:1078-1089, 1968.
34. TRABULSI, L.R. & ZULIANI, M.E. — Estudos sobre a *E. coli* 0111:B4. III — Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e a seis antibióticos. *Rev. Inst. Med. trop., São Paulo*, 11:323-334, 1969.
35. WATANABE, T. — Selected methods of genetic study of episome-mediated drug resistance in bacteria. In: EISEN, H.N., ed. — *Methods in medical research*. Chicago, Year Book Medical Publishers, Inc., 1965. vol. 10, p. 202-220.
36. WATANABE, T. & OGATA, C. — Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. IX. Recombination of an R factor with F. *J. Bacteriol.*, 91:43-50, 1966.
37. ZAHNER, H. & MAAS, W.K. — Drug resistance. In: *Biology of antibiotics*. New York, Springer-Verlag, 1972. p. 97-113.
38. ZULIANI, M.E. — *Escherichia coli* 0111:B4 — Tipos sorológicos, comportamento bioquímico, atividade colicinogênica e sensibilidade a drogas. São Paulo, 1968. Tese — Doutoramento — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Factores "R" que median resistencia para ampicilina-carbenicilina en *Citrobacter diversus*

Gustavo Prieto, Jeannette Vargas, Ada Martínez & Hilda Bracho*

Resumen

Se estudia el patrón de susceptibilidad a 14 agentes antimicrobianos de 29 cepas de *Citrobacter diversus* aisladas de material clínico humano diferente a las heces. Según el método de Bauer & Kirby, corroborado por el método de dilución seriada en tubo, el 100% de las cepas resultaron ser resistentes a ampicilina-carbenicilina, esa resistencia se demuestra es del tipo transferible por conjugación, mediada por elementos genéticos extracromosómicos del tipo de los factores "R" los cuales son transferidos del *Citrobacter diversus* hasta la *E. coli* *AM₂₀* F⁻ nal^r que actúa como receptora. El determinante de resistencia para ampicilina, presente en este factor "R", es al parecer el mismo que media resistencia para carbenicilina ya que no se logra evidenciar segregación de genes de resistencia entre ambos antibióticos, tanto en la cepa donante como en la cepa receptora, después de la conjugación. La resistencia alcanza niveles de significación clínica, oscilando en el donante entre 62.5 y 1000 µg/ml para ampicilina y entre 125 y 1000 µg/ml para carbenicilina. En la cepa receptora los niveles de resistencia obtenidos después de la conjugación están comprendidos entre 31.2 y 1000 µg/ml para ambos agentes. En términos generales los niveles de resistencia para carbenicilina son en la mayoría de las cepas estudiadas; tanto en la cepa donante como en la cepa receptora, superiores a los de ampicilina.

Summary

R factors mediating for ampicillin and carbenicillin resistance in Citrobacter diversus

The susceptibility pattern to 14 antimicrobial agents is studied in 29 strains of *Citrobacter diversus* isolated from specimens of human origin different to the stools. According to Bauer & Kirby method and corroborated by broth dilution test tube method 100% of strains developed resistance to ampicillin-carbenicillin. This resistance is transferable by conjugation, mediated by the presence of determinants of resistance that are part of R factors which are transferred from *Citrobacter diversus* to sensitive receptor strain *E. coli* *AM₂₀* F⁻ nal^r. The resistance determinant to ampicillin present in this R factor is probably the same that mediate resistance to carbenicillin because there was an absence of gene segregation between those agents in the donor strains as well as in the receptor strain after conjugation. The levels of resistance reached are clinically significant. The donor strain shows levels of resistance to ampicillin between 62.5 and 1000 µg/ml and to carbenicillin between 125 and 1000 µg/ml. The levels of resistance in the receptor strains after conjugation are between 31.2 and 1000 µg/ml for both agents. In the majority of the strains the levels of resistance to carbenicillin are generally higher than ampicillin in the donor strain as well as in the receptor strain.

Introducción

En 1972 Ewing & Davis (4) revisaron exhaustivamente la taxonomía del género *Citrobacter* y propusieron en base a precedentes históricos prioridad para la designación *Citrobacter diversus* como una segunda especie dentro de este género. Hemos creido de utilidad el estudio del patrón de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos y la caracterización de la resistencia presente en cepas de *Citrobacter diversus* aisladas en el transcurso de los años 1972-1975 de material clínico humano diferente a las heces.

Materiales y Metodos

Se estudia el patrón de susceptibilidad a 14 agentes antimicrobianos de 29 cepas de *Citrobacter diversus* procedentes todas de especímenes clínicos humanos diferentes a las heces. El método del disco único de alta potencia según criterios establecidos (2, 3) es usado para la determinación de la susceptibilidad a ampicilina-carbenicilina-streptomicina-cloramfenicol-kanamicina-ácido nalidíxico-cefalosporinas-colimicina-furadantina-gentamicina-neomicina-polimixina B-sulfonamidas y tetraciclina, utilizando discos comerciales de la casa BBL.

* Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

La técnica de dilución seriada en tubo (1), la cual permite determinar niveles de resistencia en μgr es empleada para corroborar y cuantificar la resistencia detectada por el método anterior; el inóculo utilizado es aproximadamente 10^5 bacterias.

Para caracterizar la naturaleza plasmidial de la resistencia presente en estas cepas se utiliza como cepa receptora una *Escherichia coli* AM₂₀ F⁻ *nal*^r 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *lac*⁺ *trp*⁺, la cual fué obtenida de Sidney Cohen del Departamento de Microbiología del Michael Reese Hospital and Medical Center de Chicago. Esta cepa es sensible a los agentes antimicrobianos utilizados en el estudio con excepción del desarrollo de resistencia cromosomal al ácido nalidíxico. Su sensibilidad fué estable durante todo el estudio a pesar de subcultivos repetidos. La metodología para demostrar transferencia de resistencia fué con algunas variantes la descrita por Smith & Halls (8). Un tubo conteniendo 10ml de caldo cerebro corazón es inoculado con 0.02ml de un caldo cerebro corazón de 24 horas de la cepa donante y 0.1ml de un cultivo similar de la cepa receptora, la mezcla es incubada a 35°-37°C por 24 horas y luego centrifugada, el sedimento es inoculado mediante un hisopo en un medio de selección constituido por Mac Conkey en placa de Petri, al cual se le ha incorporado ampicilina y ácido nalidíxico en concentraciones de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente, lo cual facilita la evidencia de la transferencia de la resistencia, por cuanto en estas condiciones únicamente crece en las placas la cepa receptora que ha adquirido resistencia de la cepa donante. Placas sin antibióticos son utilizadas como controles. Despues de la conjugación la identificación de la receptora *E. coli* AM₂₀ F⁻ *nal*^r se establece mediante las siguien-

tes reacciones bioquímicas: lisina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa, malonato, adonitol y citrato de Simmon's, que permiten su diferenciación del *Citrobacter diversus*.

A fin de verificar la transferencia de resistencia, a la cepa receptora le es practicado, después de la conjugación, un estudio de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos utilizados en el trabajo, siguiendo para ello exactamente la metodología utilizada inicialmente para determinar la sensibilidad de la receptora antes de la conjugación.

Resultados

Resistencia para ampicilina y carbenicilina es observada en el 100% de las cepas. Para los otros 12 agentes antimicrobianos utilizados todas las cepas muestran ser uniformemente sensibles.

En 15 cepas estudiadas los determinantes de resistencia ampicilina-carbenicilina son transferidos desde el *Citrobacter diversus* hasta la *E. coli* AM₂₀ F⁻ *nal*^r que actúa como receptora. En ninguna de estas cepas se evidencia una disociación de los determinantes de resistencia ampicilina-carbenicilina.

Las figs. 1, 2 y 3 muestran la transferencia de resistencia ampicilina-carbenicilina desde el *Citrobacter diversus* 30 hasta la *E. coli* AM₂₀ F⁻ *nal*^r.

La diferenciación bioquímica existente después de la conjugación entre la cepa donante de *Citrobacter diversus* y la cepa receptora *E. coli* AM₂₀ F⁻ *nal*^r es la reportada usualmente para ambas especies.

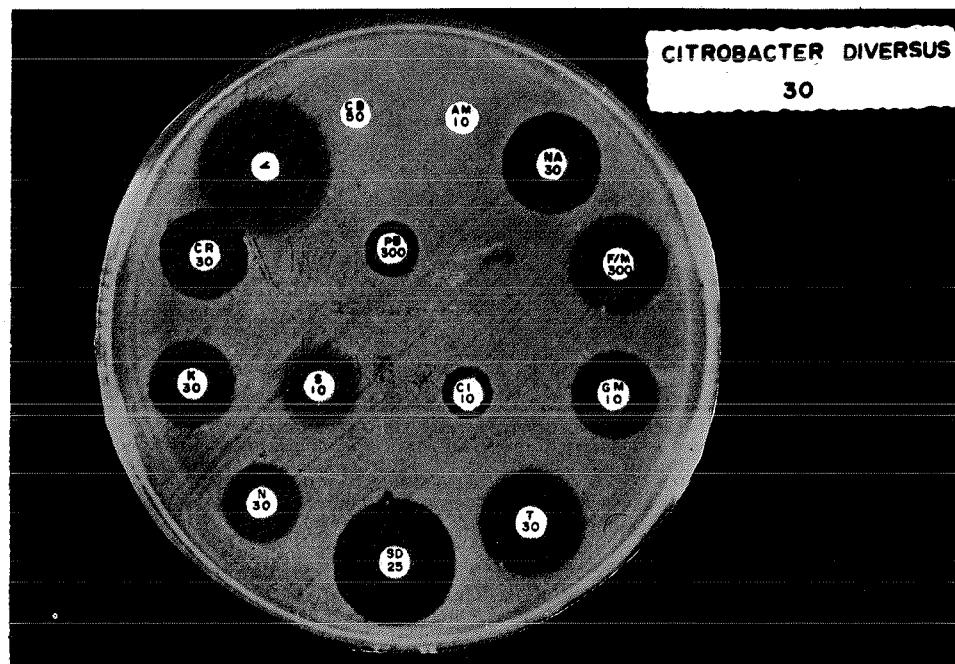


Fig. 1. — Patrón de sensibilidad y resistencia del *Citrobacter diversus* 30.

Finalmente en las tablas 1 y 2 se muestran en 15 de las cepas de *Citrobacter diversus* los niveles de resistencia para ampicilina y carbenicilina que se alcanzan tanto en la cepa donante como en la receptora; los mismos tienen significación clínica y oscilan en el donante entre 62.5 a 1000 µg/ml para ampicilina y entre 125 y 1000 µg/ml para carbenicilina. En la cepa receptora ni-

veles de resistencia obtenidos después de la conjugación están comprendidos entre 31.2 y 1000 µg/ml para ambos agentes. Observese que en términos generales los niveles de resistencia para carbenicilina son en la mayoría de las cepas estudiadas, tanto en la cepa donante como en la receptora, superiores a los de ampicilina.

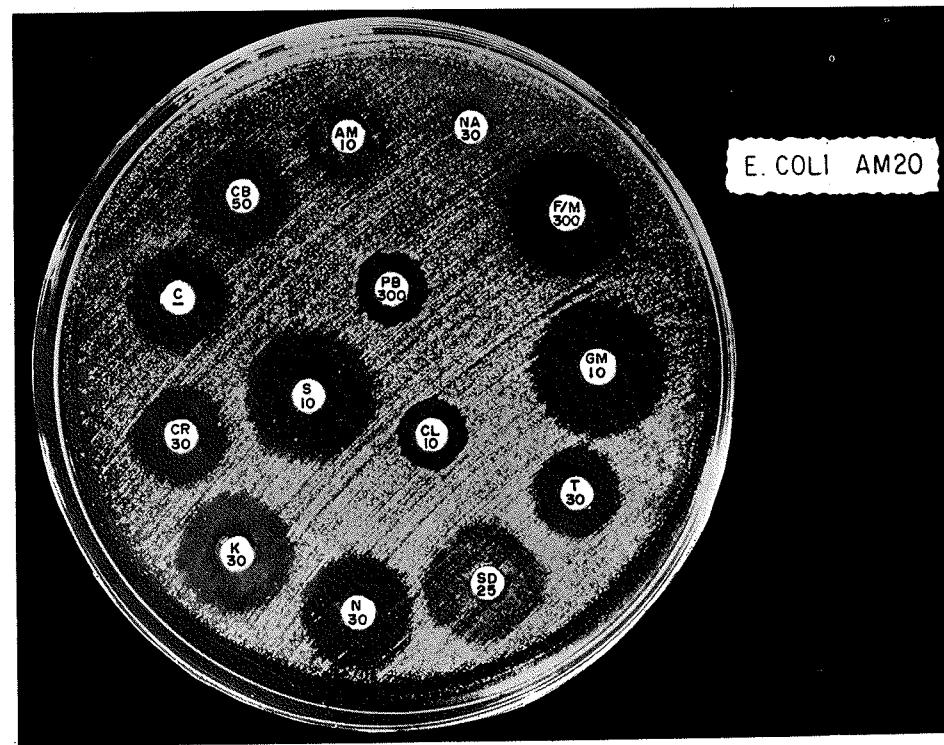


Fig. 2. — Patrón de susceptibilidad de la cepa *E. coli* AM₂₀ *nal*^r antes de ser conjugada con el *Citrobacter diversus* 30.

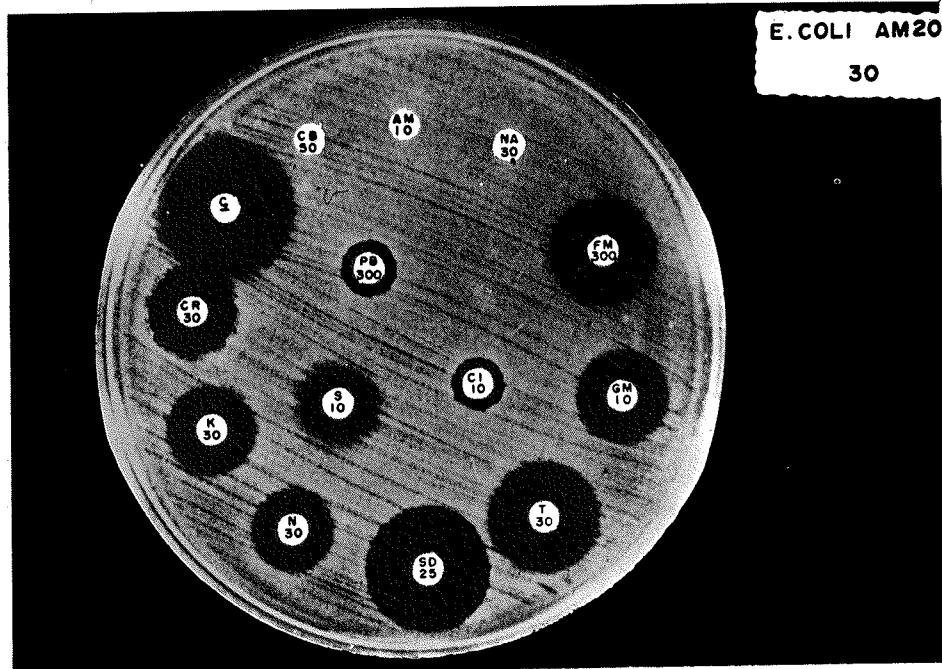


Fig. 3. — Patrón de sensibilidad y resistencia que adquiere la cepa *E. coli* AM₂₀ *nal*^r después de ser conjugada con el *Citrobacter diversus* 30.

Tabla 1

Citrobacter diversus, 15 cepas 1972 — 1975
Niveles de resistencia para ampicilina en $\mu\text{g}/\text{ml}$ conferidos por factores
"R" en la cepa donante y la cepa receptora

Nº DE CEPA	1000	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	CONTROL
C.d. 30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 30	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 12	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. 143	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 143	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. HC ₂	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. HC ₂	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
C.d. 24	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 24	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. 65	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. 3957	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 3957	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. 2A	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 2A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. 113	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
E.c. 113	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C.d. 303	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
E.c. 303	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C.d. 89	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
E.c. 89	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C.d. 614	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
E.c. 614	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C.d. 67 _B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
E.c. 67 _B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C.d. 18	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
E.c. 18	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
E.c. AM ₂₀	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

C.d. = *Citrobacter diversus*E.c. = *Escherichia coli*

+ = Se observa crecimiento

- = No se observa crecimiento

Discusion

En varios estudios realizados sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos en miembros de los géneros *Citrobacter* y *Enterobacter* ambos han sido reportados ser sensibles a carbenicilina y resistentes a la ampicilina y a las cefalosporinas, y precisamente en la resistencia a este último grupo de antibióticos se diferencian de los miembros del género *Klebsiella*. Con la ubicación del *Citrobacter diversus* dentro del género *Citrobacter*, el concepto de una uniformidad en los miembros de este género en su sensibilidad a la carbenicilina, debe ser modificado en base a una reciente publicación de Smith & Daiton (9) y a los resultados obtenidos en este estudio para el tratamiento de procesos in-

fecciosos determinados por cepas de *Citrobacter* que muestren resistencia a otros agentes antimicrobianos, debe en el futuro requerir de la diferenciación de la especie de *Citrobacter* involucrado en el proceso infeccioso, y ello es especialmente de valor, cuando se trata de la variante H₂S del *Citrobacter freundii* que constituye aproximadamente el 16% de las cepas de esa especie, ya que si bien las mismas continúan siendo sensibles a carbenicilina, las cepas de *Citrobacter diversus* reportadas en este estudio son 100% resistentes a dicho antibiótico.

La asociación de la resistencia ampicilina-carbenicilina en nuestro medio ha sido demostrada en enteropatógenos estar mediada principalmente por elementos genéticos extracromosómicos del tipo de los Factores

Tabla 2

Citrobacter diversus. 15 cepas 1972 — 1975
Niveles de resistencia para carbenicilina en $\mu\text{g}/\text{ml}$ conferidos por factores
"R" en la cepa donante y la cepa receptora

Nº DE CEPA	1000	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	CONTROL
C.d. 30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. 143	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 143	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. HC ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. HC ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. 24	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 24	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. 65	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. 3957	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 3957	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. 2A	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 2A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.d. 113	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 113	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
C.d. 303	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 303	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
C.d. 89	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 89	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C.d. 614	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 614	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C.d. 67 _B	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 67 _B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C.d. 18	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E.c. 18	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
E.c. AM ₂₀	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

C.d. = *Citrobacter diversus*E.c. = *Escherichia coli*

+ = Se observa crecimiento

- = No se observa crecimiento

"R" (5—7), pudiendo este factor "R" constituir un elemento plasmidial cuyo único determinante de resistencia es el citado o constituir al asociarse a otros determinantes de resistencia, factores "R" que median multiresistencia. Ello resulta ser también cierto para el *Citrobacter diversus* en los cuales, hasta el presente, ha asumido la primera de dichas modalidades. Para nuestro conocimiento el presente trabajo constituye la primera demostración en el *Citrobacter diversus* de la naturaleza extracromosómica de la resistencia ampi-

cilina-carbenicilina.

El determinante de resistencia para ampicilina es al parecer el mismo que media resistencia para carbenicilina ya que éste como en estudios anteriores con otros miembros de la familia Enterobacteriaceae: *Shigella*, *Salmonella* y *Escherichia coli* enteropatogénica (5—7), no se logra evidenciar segregación de genes de resistencia entre ambos antimicrobianos, tanto en la cepa donante como en la cepa receptora después de la conjugación.

Referencias Bibliograficas

1. BAILEY, W.R. & SCOTT, E. G. — Antimicrobial susceptibility testing. *Diagnostic microbiology*. Third edition p. 289-304, 1972.
2. BAUER, A.W. — Current status of antibiotic susceptibility testing with single high potency disk. *Am. J. Med. Technol.*, 32 (2): 97-102, March — April, 1968.
3. BAUER, A. W. & KIRBY — Antibiotic susceptibility testing by a standardised single method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45 (4): 493-496, April, 1966.
4. EWING, W.H. & DAVIS, B.R. — Biochemical characterization of *Citrobacter diversus* (Burkey) Werkman and Gillen and designation of the neotype strain. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 22: 12-18, 1972.
5. PRIETO, G. — Estudio de la susceptibilidad de 58 cepas de *Shigella* a 13 de agentes antimicrobianos. Factores "R" como determinantes genéticos responsables de su resistencia múltiple. *Rev. Fac. Med.* (Maracaibo), 3: 170-192, 1970.
6. PRIETO, G. — Contribución de la resistencia episomal (Factor R) a la multiresistencia de las *Salmonellas*. *Rev. Fac. Med.* (Maracaibo), 6 (1-4): 14-37, 1973.
7. PRIETO, G.; MARTINEZ, A.; ROLDAN, A. & VARGAS, J. — Resistencia episomal para carbenicilina-ampicilina en serotipos de *Salmonella*. *Rev. Fac. Med.* (Maracaibo), 6 (1-4), 57-68, 1973.
8. SMITH, H.W. & HALLS, S. — Observation on infective drug resistance in Britain. *Brit. Med. J.*, 5482: 266-269, 1966.
9. SMITH, R.; DAITON, S. & CHIPPS, D. — Recognition of *Citrobacter diversus* in the clinical laboratory. *APPL. Microbiol.*, 25: 157-158, 1973.

**Estudos comparativos entre o teste da alça ligada de intestino de coelho
e do camundongo recém-nascido na detecção da enterotoxina termoestável (ST)
produzida por *Escherichia coli****

Antonio de Pádua Franceschi*, A.F. Pestana de Castro*, Marlene B. Serafim* & Luiz Pustiglione Netto**

Resumo

Usando amostras de *E. coli* isoladas do homem, suínos e bovinos, foi realizado um estudo a fim de comparar as eficiências dos testes da alça ligada de intestino de coelho e do camundongo recém-nascido, na detecção da enterotoxina termoestável produzida por este microrganismo. O teste da alça ligada de intestino de coelho foi bastante irregular, mostrando muitos resultados negativos, assim distribuídos: 22(38,59%) para a amostra de origem humana; 27(47,36%) para a amostra isolada de suínos; 21(36,84%) e 39(68,42%) para as amostras isoladas de bovinos. Os coeficientes de variação observados nestes testes foram altos, variando de 63,01% a 71,78%. O teste do camundongo recém-nascido foi muito mais eficiente, uma vez que, para as amostras enterotoxigênicas, não foram observados resultados inferiores a 0,085 para as relações entre peso dos intestinos e peso das carcaças. Os coeficientes de variação mostraram valores entre 12,22% e 15,84%. Testes realizados com enterotoxinas tratadas pelo calor demonstraram que, quando o ensaio era feito em coelhos, a atividade era completamente destruída a 120°C por 30 minutos. No teste do camundongo recém-nascido algumas diferenças puderam ser observadas em relação à amostra B42 (origem bovina) cuja atividade de ST foi parcialmente destruída a 100°C por 30 minutos. Redução da atividade foi também observada em preparações desta amostra aquecida a 90°C por 30 minutos.

Summary

Comparative studies between the rabbit ileal loop assay and the infant mouse test to detect heat-stable enterotoxin (ST) produced by Escherichia coli

A comparative study using *E. coli* isolated from man, swine, and bovine was carried out to compare the efficiencies of the rabbit ileal loop assay and the infant mouse test in the detection of heat-stable enterotoxin produced by that microorganism. The rabbit ileal loop assay was very irregular showing many negative results distributed as follows: 22(38,59%) for the strain isolated from man; 27(47,36%) for the strain isolated from swine; 21(36,84%) and 39(68,42%) for the strains isolated from bovine. The coefficients of variation were high, ranging from 63,01% to 71,78%. The infant mouse test was much more efficient since, for the intestine to body weight ratios the coefficients of variation showed values between 12,22% and 15,84%. Tests carried out with heat-treated enterotoxins demonstrated that when the assay was carried out in rabbits the activity was completely destroyed at 120°C for 30 minutes. In the infant mouse test some differences could be observed in regard to strain B42 (bovine origin) whose ST activity was partially destroyed at 100°C for 30 minutes. Reduced activity was also observed in preparations of this strain heated at 90°C for 30 minutes.

Introdução

A produção de enterotoxinas por certas amostras de *Escherichia coli*, isoladas do homem e várias espécies de animais domésticos, parece explicar o grande número de casos de diarréia provocada pelo microrganismo.

Sabe-se atualmente que amostras enterotoxigênicas de *E. coli* produzem, isoladamente ou em conjunto, dois tipos de enterotoxinas. Uma termolábil (LT), de alto peso molecular, bastante semelhante biológica e sorologicamente à enterotoxina de *Vibrio cholerae*, é capaz de provocar, na alça ligada, de intestino de coelho, dilatação e acúmulo de líquido (10). A produção de um fator

de permeabilidade capilar (5) e o efeito citopático em células de linhagem Y1 (3) são outros efeitos biológicos específicos desta toxina, os quais tem sido utilizados para sua detecção e dosagem. A outra enterotoxina é termoestável (ST), de baixo peso molecular, pouco conhecida quanto à sua natureza química (8) e com evidências de não ser antigênica, o que dificulta bastante a sua caracterização (7).

A toxina ST também causa dilatação da alça ligada, de intestino de coelho, mas o tempo de latência é muito mais curto, atingindo o máximo quando a dilatação resultante da toxina LT está em sua fase inicial (4). Em virtude destas características, o teste da alça ligada, de in-

* Trabalho realizado com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq. Processo 2222-0732/75 Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, 13.100- Campinas, S.P.

**Instituto Biológico de São Paulo, SP.

testinos de coelho, lido com 6 horas após a inoculação da toxina, tem sido utilizado para a avaliação da produção de ST (4).

Os parâmetros de positividade da toxina ST, na maioria dos testes, têm sido a dilatação e o acúmulo de líquido na alça ligada, de intestino de coelho. Entretanto, Sack & col. (11) determinaram que, para amostras de *E. coli*, de origem humana, produtores de toxina ST, exclusivamente, o teste deve ser considerado positivo quando a relação entre o volume de líquido e o comprimento da alça for igual ou superior a 0,4.

Outro teste, que tem sido largamente empregado na avaliação da toxina ST, pelo menos com relação às amostras de origem humana, é o do camundongo recém-nascido (2). O teste baseia-se na relação entre o peso dos intestinos e das carcaças, de cada lote de animais, submetidos à inoculação intraestomacal de preparações de toxina ST, dando-se como positivo aqueles cujos resultados forem superior a 0,084 (6,13).

Já foram feitos vários estudos sobre os dois testes para ensaio da toxina ST e sabe-se que, quando a toxina é aquecida a 100°C durante 15 minutos, o comportamento dos animais será diferente (13). No teste da alça ligada, de intestino de coelho, ainda haverá dilatação, porém, pelo teste em camundongos recém-nascidos, os resultados poderão ser negativos. No que concerne ao teste realizado em coelhos, verificamos a necessidade de estudos quantitativos, à semelhança do que foi realizado por Sack & col. (11), com amostras de origem humana.

Os parâmetros de positividade, para a toxina ST de *E. coli*, foram analisados a partir de comparações dos dois testes mencionados, com amostras de origem humana, bovina e suína. A avaliação envolveu, inclusive, amostras de toxinas previamente submetidas a diferentes tratamentos térmicos.

Material e métodos

Foram utilizadas as seguintes amostras de *E. coli* produtoras exclusivamente de toxina do tipo termoestável (ST): (a) amostra 3, sorotipo 0128; B12, de origem humana, isolada em Campinas, de um caso de diarréia infantil; (b) amostra E57, de origem suína, enviada pelo Dr. Carlton L. Gyles, Department of Veterinary Microbiology and Immunology, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Ontario, Canadá; (c) amostras B41 e B42, ambas isoladas de bovinos e enviadas pelo Dr. Willians Smith, Houghton Poultry Research Station, Huntingdon, Great Britain. Como amostra não toxigênica, foi utilizada *Escherichia coli*, 711 nal, enviada pelo Dr. Carlton L. Gyles.

Preparo da toxina termoestável — Cada amostra foi semeada em frascos tipo Erlenmeyer, com capacidade pa-

ra 500ml e contendo não mais de 80ml de meio de Evans (5). Após a semeadura, foi feita incubação em estufa com agitação (150rpm), a 37°C, durante 18 horas. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 6.000rpm durante 45min., coletando-se, cuidadosamente os três quartos superiores dos sobrenadantes.

Destes, porções de 2ml foram distribuídas em tubos e mantidas em congelador a -20°C, por tempo não superior a três meses, durante o qual foram realizados os testes em coelhos e camundongos.

Teste da alça ligada de intestino de coelho — Coelhos albinos, raça Nova Zelândia, com idade não superior a 2 meses, pesando em média 1,8 kilogramas, foram mantidos em jejum, 48 horas antes do teste, recebendo apenas água.

Com anestesia por uretana (solução a 25% em água, na dose de 5 a 7ml por kilo de peso), foi empregada a técnica cirúrgica recomendada por Burrows & Mustekis (1), com algumas modificações.

Após tricotomia, foi feita antisepsia do campo cirúrgico com álcool iodado a 5% e proteção com campos estéreis. Foi feita em seguida a incisão de aproximadamente 3cm de comprimento, na linha mediana da parede abdominal, tendo como ponto médio a cicatriz umbilical. O intestino delgado foi exposto, numa extensão de 60cm, medidos a partir do apêndice ileocecal, no sentido disto-proximal. Na extremidade proximal, foi feita a ligadura e todo o segmento lavado com salina estéril aquecida a 37°C (volume aproximado de 10 a 20ml). Nova ligadura era feita, com o objetivo de isolar o ponto de inoculação. Após delicado movimento da alça, para escoamento de todo o líquido fisiológico, a extremidade distal foi também ligada.

Pela técnica da ligadura foram feitas 10 e 11 alças, medindo 5cm aproximadamente. Entre cada alça, foi feita outra menor, de aproximadamente 0,5 cm. Em cada coelho, foram feitos controles negativos, que consistiram da injeção, nas alças, de sobrenadante de cultura de *E. coli*, 711 nal. As alças restantes foram utilizadas para os testes com diferentes toxinas, na proporção de 3 alças por toxina.

Doses de 1ml de cada uma das toxinas preparadas foram inoculadas em 57 alças, compreendendo, em média, 6 coelhos para cada toxina. Em seguida o intestino foi recolocado na cavidade abdominal, suturando-se o peritônio, camada muscular e pele, com pontos separados. Os animais, ainda sob o efeito da anestesia, foram mantidos por 6 horas, sendo então sacrificados.

O intestino, compreendendo a região das alças ligadas, foi retirado e observado quanto à presença de dilatação. O comprimento de cada alça foi revisto, retirando-se, com seringa, o líquido contido.

A relação entre o volume de líquido e o comprimento da alça foi calculada, considerando-se como positiva a igual ou superior a 0,4, conforme recomendam Sack & col. (11).

Testes do camundongo recém-nascido — Para este teste, procedeu-se conforme descrito por Dean & col. (2), modificando-se apenas o valor mínimo, para testes positivos, de 0,09 para 0,085, de acordo com o preconizado por Whipp & col. (13).

Quantidades de 0,1ml de cada toxina foram injetadas, por via intraestomacal, em 10 lotes de quatro camundongos, no total de 40 animais, por toxina. Após manutenção em estufa, a 28°C por quatro horas, os animais foram sacrificados, necropsiados e os seus intestinos observados quanto à dilatação, seguindo-se de sua remoção e calculando-se, para cada lote, a relação entre peso dos intestinos e das carcaças.

Tratamento térmico na toxina ST e respostas aos testes em coelhos e camundongos — Aliquotas das amostras de toxinas foram aquecidas a 60°C, 80°C, 90°C, 100°C e 120°C, durante 30min. e, em seguida, congeladas a -20°C, por tempo não superior a três meses, durante o qual foram realizados os ensaios em coelhos e camundongos. Para o teste da alça ligada, de intestino de coelho, um total de 4 alças, duas por coelhos, foram inoculadas com 1ml da cada toxina, aquecida a uma das temperaturas indicadas, repetindo-se a metodologia já descrita.

Para o teste em camundongos recém-nascido, para cada preparado, com atividade de ST, submetido a uma das temperaturas mencionadas, foram utilizados quatro lotes de quatro camundongos.

Resultados

Teste da alça ligada de intestino de coelho — Os resultados dos testes (Tabela 1) revelam que, para as amostras toxigênicas, a média das relações, entre volume de líquido contido nas alças e o comprimento destas, com uma única exceção (amostra B42), foi sempre superior ao índice 0,4, proposto por Sack & col. (11).

Com relação à amostra controle, 711 nal, o valor da média está bem distante do mínimo proposto para a positividade do teste.

Os demais dados da Tabela 1 revelam que os resultados neste tipo de teste foram bastante flexíveis. Em várias oportunidades, houve elevado índice de resultados negativos, a saber: amostra 3, 22 alças negativas (38,58%); amostra E57, 27 negativas (47,36%); amostra B41, 21 negativas (36,84%) e amostra B42, 39 negativas (68,42%). Em relação aos valores mínimos obtidos, foram verificados, em todos os casos, resultados nos quais a resposta, à ação da toxina, foi praticamente nula. Em relação ao sobrenadante da cultura controle, 711 nal, examinada de modo semelhante, verifica-se que a maioria (91,04%) dos testes resultou em valores inferiores a 0,4, embora, em seis casos (8%), tenham sido obtidos resultados iguais ou superiores a 0,4. O cálculo dos coeficientes de variação, obtidos a partir dos resultados observados, forneceu, independentemente da amostra em estudo, valores bastante elevados, entre 63,01% e 71,78%.

Teste do camundongo recém-nascido — A média das relações entre peso dos intestinos e peso das carcaças nos 10 lotes de camundongos inoculados com cada toxina foi sempre superior a 0,085 (Tabela 2). No que diz respeito à amostra controle, 711 nal, a média dos valores obtidos, 0,061, está relativamente distante do valor mínimo proposto para a positividade. Os resultados foram relativamente homogêneos, não se observando para qualquer toxina valores inferiores a 0,085. No caso da amostra controle, 711 nal, o maior valor obtido, entre 10 lotes de camundongos, foi 0,072, bem distante do valor mínimo para positividade do teste (0,085).

Independentemente da origem da amostra e de ser ou não toxigênica, os resultados foram homogêneos, como indicam os coeficientes de variação: 15,84% para a amostra 3; 14,64% para a amostra E57; 12,22% para a amostra B41; 12,91% para a amostra B42 e 10,19% para a amostra 711 nal.

Tabela 1

Resultados dos testes da alça ligada de intestino de coelho, realizados com sobrenadantes das culturas de *E. coli* 3, E57, B41, B42 e 711 nal

Sobrenadantes de culturas	Número de alças	Média da relação volume de líquido/comprimento da alça	Valor máximo da relação volume do líquido/comprimento da alça	Valor mínimo da relação volume de líquido/comprimento da alça	Desvio padrão	Coeficiente de variação	Número e percentagem de resultados inferiores a 0,4 *
<i>E. coli</i> 3	57	0,567	1,600	0	0,407	71,78%	22 (38,59%)
<i>E. coli</i> E57	57	0,411	1,100	0	0,259	63,01%	27 (47,36%)
<i>E. coli</i> B41	57	0,505	1,640	0,028	0,343	67,92%	21 (36,84%)
<i>E. coli</i> B42	57	0,340	1,250	0	0,253	74,41%	39 (68,42%)
<i>E. coli</i> 711 nal	67	0,187	0,606	0	0,119	63,63%	61 (91,04%)

*Índice de positividade (11)

Tabela 2
Resultados dos testes em camundongos recém-nascidos, realizados com sobrenadantes das culturas de *E. coli* 3, E57, B41, B42 e 711 nal

Sobrenadantes de culturas	Nº de lotes	Média da relação peso do intestino/peso da carcaça	Valor mínimo da relação peso do intestino/peso da carcaça	Valor mínimo da relação peso do intestino/peso da carcaça	Desvio padrão	Coeficientes de variação	Número e porcentagem de resultados inferiores a 0,085*
<i>E. coli</i> 3	10	0,106	0,163	0,085	0,0168	15,84%	0 (0%)
<i>E. coli</i> E57	10	0,097	0,135	0,092	0,0142	14,64%	0 (0%)
<i>E. coli</i> B41	10	0,117	0,134	0,089	0,0143	12,22%	0 (0%)
<i>E. coli</i> B42	10	0,120	0,150	0,087	0,0155	12,91%	0 (0%)
<i>E. coli</i> 711 nal	10	0,061	0,072	0,050	0,0062	10,19%	10 (100%)

*Índice de positividade (13)

Tabela 3

Efeito do tratamento térmico nos sobrenadantes das culturas de *E. coli* 3, E57, B41 e B42, ensaiados no teste da alça ligada de intestino de coelho

Tratamento térmico por 30 minutos	Número de alças (testes)	Número de positivos*
120°C	16	0
100°C	16	9
90°C	19	11
80°C	16	9
60°C	16	10

* Valores da relação de líquido/comprimento da alça iguais ou superiores a 0,4 (11)

Efeito do tratamento térmico

Teste da alça ligada de intestino de coelho — Em virtude da irregularidade de comportamento dos animais, já indicada e considerando-se que para cada toxina, submetida a uma determinada temperatura, foram feitas apenas quatro alças, uma análise individual ficaria extremamente difícil. Por este motivo, são apresentados os resultados dos testes em conjunto (Tabela 3), tomando-se, como índice de positividade, valores cuja relação entre volume de líquido intestinal e comprimento da alça foram iguais ou superiores a 0,4. A preparação obtida a partir da amostra B42, submetida a tratamento térmico, comportou-se, em coelhos, de maneira semelhante, por isso, foi incluída na Tabela 4. No teste da alça ligada de intestino de coelho, os preparados com atividade de ST foram inativados após aquecidos a 120°C, por 30min.

Com tratamento a 100°C por igual tempo, a atividade de ST foi evidente em todos os preparados, porém com a mesma irregularidade observada em preparados não aquecidos.

Teste de camundongo recém-nascido — À semelhança do que ocorreu em coelhos, todas toxinas foram inativa-

Tabela 4

Efeito do tratamento térmico em sobrenadantes das culturas de *E. coli* 3, E57, B41 e B42, ensaiados no teste do camundongo recém-nascido*

Temperatura** Sobrenadantes	120°C	100°C	90°C	80°C	60°C	Nenhum tratamento
<i>E. coli</i> 3	0,065	0,149	0,141	0,147	0,119	0,121
<i>E. coli</i> E57	0,062	0,104	0,141	0,129	0,116	0,128
<i>E. coli</i> B41	0,068	0,147	0,127	0,138	0,141	0,142
<i>E. coli</i> B42	0,069	0,080	0,097	0,131	0,137	0,120

*Cada valor representa a média das relações entre peso do intestino e peso das carcaças, em quatro lotes de camundongos

**Durante 30 minutos

das quando submetidas a aquecimento a 120°C, durante 30min.

O aquecimento a 100°C não inativou as toxinas, exceto em relação à produzida pela amostra B42, de origem bovina, cuja atividade foi bastante reduzida após o aquecimento, a ponto de apresentar resultados inferiores ao índice mínimo de positividade.

O aquecimento desta toxina a 90°C ainda revelou algum efeito na diminuição de sua atividade (Tabela 4).

Discussão

Embora diversos autores (4, 11, 12) tenham utilizado o teste da alça ligada do intestino de coelho, para estudo de amostras de *Escherichia coli* produtoras de toxina termoestável, os resultados por nós obtidos demonstraram ser esta prova bastante irregular.

Ensaios realizados com quatro amostras de *E. coli* produtoras de ST, isoladas do homem, suínos e bovinos, revelaram que, independentemente da origem da amostra, os coeficientes de variação obtidos foram

elevados, com valores compreendidos entre 63,01% e 74,41%.

O uso da quantificação proposta por Sack & col. (11) para a avaliação dos resultados indica que, para as toxinas empregadas, o número de testes não positivos foi surpreendente, com índices de negatividade entre 36,84% e 68,42%.

Os dados obtidos, em relação às amostras de origem suína e bovina, concordam com os de Smith & Halls (12). Entretanto, embora estes autores tivessem obtido, com amostras de origem humana, resultados regularmente positivos, as observações, com amostra de origem humana, não permitiram confirmá-los, uma vez que esta se comportou nestes testes de modo semelhante às amostras E57, B41 e B42. Smith & Halls fizeram leitura do teste da alça ligada de intestino de coelho 24 horas após a inoculação, sendo possível que, em alguns dos resultados, tivessem computado, também o aumento de líquido intestinal, eventualmente decorrente de produção de toxina termolábil (LT). Os autores usaram ainda culturas bacterianas e não os sobrenadantes, como adotado no presente trabalho. Em relação à amostra 711 nal, não toxigênica, verificou-se que o coeficiente de variação foi elevado, ocorrendo seis casos em que a relação volume de líquido e comprimento de alça foi superior a 0,4.

Diante destes resultados, mesmo antes de compará-los com os testes realizados em camundongos, conclui-se que, nas condições experimentais e metodologia adotadas na presente avaliação, os dados ora observados desaconselham a utilização do teste da alça ligada de intestino de coelho, como método de ensaio para a toxina ST.

Quando as preparações com atividade de ST foram examinadas pelo teste do camundongo recém-nascido, os resultados foram opostos. Os valores das relações entre peso de intestinos e pesos de carcaças, para as amostras toxigênicas, foram sempre iguais ou superiores a 0,085, estando pois de acordo com os dados relatados por outros autores que têm utilizado o modelo (2, 11, 13).

Os coeficientes de variação, obtidos nos testes positivos, foram semelhantes aos recentemente relatados por Gianella (6), dando valores compreendidos entre 12,22% e 15,84%, demonstrando, pois, que o teste exibe reprodutibilidade razoável.

Tomando-se o índice de 0,085 como valor mínimo de positividade, verifica-se, ao contrário do que ocorre

com coelhos, que nenhum resultado negativo foi obtido com as amostras toxigênicas.

Confirmado a eficiência do método, com camundongos recém-nascidos, verifica-se que os testes realizados com preparados da amostra não toxigênica, 711 nal, não forneceram, em nenhuma oportunidade, valores próximos ou superiores a 0,085, estando o valor máximo obtido, 0,072, ainda relativamente distante. O coeficiente de variação obtido com a amostra não toxigênica, embora inferior, esteve próximo dos demais, demonstrando, provavelmente, que as diferenças observadas nos testes positivos sejam mais devidas a variações individuais do que a uma variabilidade do teste propriamente dito. Isto revela a superioridade do modelo camundongo recém-nascido, quando confrontado com o da alça ligada de intestino do coelho.

Apesar da irregularidade do teste da alça ligada, de intestino de coelho, verifica-se que preparados de toxina das diferentes amostras foram invariavelmente destruídos pelos tratamento térmico, a 120°C, durante 30 minutos, o que não ocorre a 100°C, no mesmo tempo.

No teste de camundongo recém-nascido, os resultados obtidos com os preparados de toxinas submetidas a tratamento térmico foram idênticos aos conseguidos em coelhos, com relação às amostras 3, E57 e B41, as quais foram inativadas a 120°C, durante 30 minutos, mas não a 100°C, no mesmo tempo. No que diz respeito à amostra B42, verifica-se, supreendentemente, que os resultados dos testes realizados com o sobrenadante, aquecido a 100°C, durante 30 minutos, fornecem valores inferiores ao mínimo 0,085; a 90°C, durante 30 minutos, a atividade de ST foi bastante diminuída.

Os resultados confirmam a opinião de Whipp & col. (13) para quem a inativação de ST, pelo calor, pode, eventualmente, se processar a 100°C, quando se usa o teste do camundongo recém-nascido. O decréscimo da atividade de ST, por aquecimento a 100°C, também foi obtido por Gianella (6).

As evidências indicam, portanto, que a termoestabilidade da toxina do tipo ST não pode ser estabelecida em termos absolutos, sendo provável que existam, na realidade, mais que um tipo de toxina ST, com diferentes propriedades de inativação frente ao calor.

Não há certeza se a diferença observada nos dois tipos de testes, para avaliação de toxina ST, é consequência de variação individual, inerente às espécies consideradas, ou se é simplesmente um problema relacionado à idade dos animais usados.

Referências Bibliográficas

- BURROWS, W. & MUSTEKIS, G.M — Cholera infection and toxin in the rabbit ileal loop. *J. Infect. Dis.*, 116:183-190, 1966.
- DEAN, A.G.; CHING, Y.C.; WILLIANS, R.G. & HARDEN, L.B. — Test for *E. coli* enterotoxin of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1972.
- DONTA, S.T.; MOON, H.W. & WHIPP, S.C. — Detection of heat labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science*, 183:334-336, 1974.
- EVANS, D.G.; EVANS, D.J. & PIERCE, N.F. — Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 7:873-880, 1973.

5. EVANS, D.J.; EVANS, D.J. & GORBACH, S.L. — Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.*, 8:725-730, 1973.
6. GIANELLA, R.A. — Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: Characteristics of the model. *Infect. Immun.*, 14:95-99, 1976.
7. GYLES, C.L. — Discussion: heat-labile and heat-stable forms of the enterotoxin from *E. coli* strains enteropathogenic for pigs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 176:314-332, 1971.
8. JACKS, M. & WU, B.J. — Biochemical properties of *Escherichia coli* low-molecular weight, heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.*, 9:342-347, 1974.
9. MOON, H.W.; WHIPP, S.C.; ENSTROM, G.W. & BAETZ, A.L. — Response of the rabbit ileal loop to cell-free products from *Escherichia coli* enteropathogenic for swine. *J. Infect. Dis.*, 121:182-187, 1970.
10. SACK, R.B. — Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 29:333-353, 1975.
11. SACK, D.A.; MERSON, M.H.; WELLS, J.G.; SACK, R.B. & MORRIS, G.K. — Diarrhea associated with heat-stable enterotoxin producing strains of *Escherichia coli*. *Lancet*, 1:239-241, 1975.
12. SMITH, H.W. & HALLS, S. — Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. *J. Path. Bact.*, 93:499-529, 1967.
13. WHIPP, S.C.; MOON, H.W. & LYON, N.C. — Heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin production in vivo. *Infect. Immun.*, 12:240-244, 1975.

Titulação de anticorpos diftérico e tetânico pelo método de absorção de sangue integral em papel de filtro*

Edison Paulo Tavares de Oliveira, Hideyo Iizuka
Hisako Gondo Higashi & Joana Akiko Furuta

Resumo

Modificação do método de absorção de sangue, de uma única punctura de polpa digital ou do lóbulo da orelha, em papel de filtro, devido a dificuldades para a impregnação total e homogênea, em quadrados de 4 x 4cm. O uso de papel com menor área, medindo 2,8 x 2,9cm, a melhoria no processo de eluição e a titulação dos soros, através da reação de neutralização, dão resultados com maior segurança, sem diferenças significativas nos títulos das dosagens, quando comparados com a técnica original.

Summary

Diphtheric and tetanic antibody titration by the method of blood absorption in filter paper.

Modification of the method of blood absorption in filter paper rendered improved results through neutralizing procedures and reduction of the size of the substrate to 2.8 x 2.9 cm.

Introdução

A busca de métodos práticos para a coleta de amostras de sangue de vacinados foi estimulada pela necessidade de verificação dos títulos de anticorpos, antes das vacinas e depois delas, principalmente nas campanhas de vacinação em massa, ou em grupos populacionais numerosos (3, 7). As principais dificuldades residem no trauma, no momento da coleta; na quantidade de soro necessária para a titulação; a conservação estéril das amostras e sua remessa para os laboratórios de dosagens (4).

O problema assumia proporções maiores na coleta de sangue de crianças, sendo que as objeções e reações emocionais dos pais são às vezes tão fortes que mesmo pequenas quantidades de sangue não podem ser obtidas (4). A reação emocional — de pais e crianças — restringe o volume de sangue necessário para a titulação. Quando a coleta é feita antes da primeira dose vacinante, para a determinação do título de anticorpos, pode ocorrer que os pais não mais retornam com a criança, para a segunda dose vacinante.

Considerando tais circunstâncias, Mirchamsy & col.(4), desenvolveram método de punctura da polpa digital ou do lóbulo da orelha, com absorção do sangue em papel de filtro Whatman nº 31, medindo 4 x 4cm. Segundo os autores, seria armazenado 0,3ml de sangue, sem deixar áreas brancas.

A reprodução da técnica revela, todavia, que a quantidade de sangue para embeber totalmente o papel é bem maior do que 0,3ml, aproximando-se de 0,6ml. Conseqüentemente, tornava-se necessário mais de uma punctura, o que dificultava o trabalho de coleta. A eluição do soro também era dificultada, pelo tamanho do papel e o eluato obtido nem sempre apresentava, quando titulado, resultados reproduutíveis, para a mesma amostra.

Em vista disso, foram introduzidas modificações na técnica original, visando a facilitar a coleta de amostras e a obtenção de eluato sérico cujos títulos apresentassem condições satisfatórias de reproduutibilidade.

Material e Métodos

A coleta inicial da amostra de sangue foi feita simultaneamente por punção venosa e por punctura da polpa digital, para possibilitar a realização do doseamento comparativo. No primeiro caso, faz-se a separação do soro, logo após a coagulação no tubo; no segundo, o sangue derivado de punctura da polpa digital, através de lanceta tipo Frankel, é colhido em fragmento retangular de papel de filtro Whatman nº 31, medindo 2,8 x 2,9cm, preso por uma pinça. Os fragmentos eram

* Instituto Butantan, Caixa Postal 65, 01000 São Paulo SP.

previamente acondicionados em envelopes e, nestas condições, esterilizados. Quando a amostra de sangue era obtida no campo, os fragmentos eram dessecados à temperatura ambiente, acondicionados em envelopes e identificados com o nome do paciente, para serem remetidos ao laboratório.

O tamanho do papel de filtro foi padronizado em fragmentos de 2,8 x 2,9cm, pois uma única punctura é suficiente para a impregnação homogênea e total, absorvendo volume de sangue igual a 0,3ml.

A titulação dos anticorpos diftéricos foi realizada conforme a técnica de Roemer & Sames (5) e dos anticorpos tetânicos por aquela preconizada pelo National Institute of Health (2), realizada em camundongos e os títulos analizados a partir de 0,01 U.I. até 1 U.I. (6, 9).

Papéis de filtro em duplicatas, absorvidos com sangue das amostras tituladas, foram conservadas em dessecador na geladeira, durante cerca de um ano para posterior verificação, com o fito de detectar a possível variação do título.

Modelo experimental — Para padronizarmos a área de papel de filtro Whatman nº 31, necessário para absorção do sangue destinado à titulação das antitoxinas diftéricas e tetânica, foi realizada uma série de experimentos preliminares. Assim, optamos por uma área que, embora absorvesse volume relativamente pequeno de sangue, fornecesse quantidade de soro suficiente para as titulações. Desta maneira, foi estandardizado o retângulo de papel com a dimensão de 2,8 por 2,9cm.

Para nos cientificarmos da total eluição de soro contido nos papéis, fizemos vários testes paralelos. De 12 indivíduos, titulamos os anticorpos do soro obtido por punção venosa, cotejando-os com os títulos obtidos através da técnica de absorção de sangue em papel.

A quantidade de sangue necessária para ser absorvida homogeneamente por toda superfície do papel, sem deixar áreas brancas, era de 0,3ml, conseguida com uma única punctura de polpa digital ou do lóbulo da orelha.

Uma vez padronizado o tamanho do papel e determinado o volume do sangue para impregná-lo, verificamos que, subdividindo o papel em 16 a 20 frações, conseguimos melhores resultados no processo de eluição do soro. Após o recorte, os fragmentos eram colocados em tubos de dosagem e o soro redissolvido até completar o volume de 1,5ml, pela adição de 1,35ml de solução de proteose peptona a 1% (8). Nestas condições, eram mantidos à temperatura de 4°C, até o dia seguinte, a fim de completar a eluição total do soro, quando então procedímos aos doseamentos dos anticorpos circulantes.

De conformidade com o preconizado por Mirchamsy & col. (4), estipulamos, arbitrariamente, que cada amostra de sangue conteria 50% de soro e os restantes 50%, elementos figurados. Conseqüentemente, obtém uma diluição inicial do soro ao décimo (4).

Resultados e Discussão

As titulações comparativas revelam que não há diferença significativa entre os títulos no soro, por punção venosa, e no eluato em papel de filtro, tanto para a antitoxina diftérica, como para a tetânica (tabela I). Este resultado está de acordo com Mirchamsy & col. (4).

Duplicatas das coletas processadas, mantidas em geladeira durante 12 meses, deram resultados idênticos às titulações originais, o que já foi demonstrado por Karstad & col. (1).

A similaridade e uniformidade das titulações revelam que o retângulo impregnado com sangue, subdividido em 16 a 20 frações para eluição do soro em tubos de dosagem dá resultados mais seguros.

A utilização do papel de filtro de tamanho reduzido, em retângulos de 2,8 x 2,9cm é a dimensão ideal para a impregnação com quantidade menor de sangue (0,3ml), para uma eluição total do soro, quando então são feitas as titulações dos anticorpos circulantes.

A análise da Tabela 1 revela que a titulação paralela e comparativa dos anticorpos diftérico e tetânico, pelos dois processos de colheita do sangue, não apresenta variação nos títulos do soro obtido do sangue por punção venosa e nos do eluato de sangue, para ambas as antitoxinas nas 12 amostras estudadas. Esta afirmação está de acordo com Mirchamsy & col. (4).

Além das dosagens apresentadas na tabela, foram realizadas dezenas de outras titulações, sem que fossem detectadas diferenças significativas, nos resultados obtidos. Isto confirma que o uso do papel de filtro de tamanho reduzido, proporcionando a impregnação com quantidade menor de sangue, também conduz aos mesmos resultados.

Pudemos verificar, também, que o sangue impregnado em papel e convenientemente estocado, conserva o título em anticorpos específicos por considerável espaço de tempo, conforme o já demonstrado por Karstad & col. (1).

Tabela 1

Dosagem paralela de antitoxinas tetânica e diftérica

Amostra Nº	Antitoxina Tetânica (UI/ml)		Antitoxina Diftérica (UI/ml)	
	Soro ^(a)	Papel de filtro ^(b)	Soro ^(a)	Papel de filtro ^(b)
1	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
3	0,01	0,01	>0,1 < 0,5	0,5
4	<0,01	<0,01	0,5	0,5
5	0,1	0,1	0,1	0,1
6	> 0,01 < 0,1	> 0,01 < 0,1	1	1
7	> 0,1 < 0,5	> 0,1 < 0,5	0,01	0,01
8	0,5	0,5	> 0,01 < 0,1	0,01
9	> 0,01 < 0,1	> 0,01 < 0,1	< 0,01	< 0,01
10	0,1	0,1	< 0,01	< 0,01
11	> 0,01 < 0,1	> 0,01 < 0,1	< 0,01	< 0,01
12	<0,01	<0,01	0,01	0,01

(a) Amostra obtida pelo método da punção venosa

(b) Amostra coletada pela técnica de puntura e absorvida em papel de filtro

Referências Bibliográficas

1. KARSTAD, L.; SPALATIN, J. & HANSON, R.P. — Application of the paper disc technique to the collections of whole blood and serum samples in studies on eastern equine encephalomyelitis. *J. Infect. Dis.*, Chicago, 101: 295-299, 1957.
2. MINIMUM REQUERIMENTS — U.S. Departament of Health, Education and Welfare Public Health Service Maryland, 4 th Revision, Dec. 15, 1952.
3. MIRCHAMSY, H., TASLINI, H. & AGHDACHI, M. — Sur la préparation et l'utilisation des vaccins associés. Antidiphérique, antitétanique et anticoquelucheux. *Archs. Inst. Hessarek* (Inst. Razi), 14:83-107, 1962.
4. MIRCHAMSY, H.; NAZARI, F.; STELLMAN, C. & ESTERABADY, H. — The use of dried whole blood absorbed on filter-paper for the evaluation of diphtheria and tetanus antitoxins in mass surveys. *Arch. L. Inst. Razia*, 21:7-5, 1969.
5. ROEMER, H.P. & SAMES, T. — Zur Bestimmung sehr kleiner mengen Diphterieantitoxins. *Z. Immun. Forsch.*, 3:344-351, 1909.
6. SURI, V.C.; DHILLON, H. & GREWAL, H.S. — Active immunization of women in pregnancy for prevention of neonatal tetanus. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 31(3):349-357, 1964.
7. TAYLOR, E.M. & MOLONEY, P.J. — Assay of diphtheria and tetanus antitoxins in small volumes of blood. *Canad. J. Publ. Hlth.*, 51:135-138, 1960.
8. WADSWORTH, A.B. — Standards Methods. Baltimore: Williams & Wilkins, 1947. p. 223-F60.3.
9. WHITE, W.G. et al. — Duration of immunity after active immunization against tetanus. *The Lancet*, II (7.611):95-96, 1969.

Production of subtilopeptidase by a strain of *Bacillus subtilis*

R. M. Attia*, Rawia F. Gamal** & S. A. Z. Mahmoud

Summary

Of 191 microorganisms isolated from air, retting liquor, soil, meat and hides a strain of *Bacillus subtilis* was found to be very active in producing subtilopeptidase. Starch and ammonium phosphate were the best carbon and nitrogen sources respectively for exo-enzyme production. Of the agricultural by-products and wastes studied cane sugar molasses gave the highest activity as carbon source, whilst corn steep precipitate or gluten was the best nitrogen sources. Magnesium has an activating effect on exo-protease production. The microorganism shows optimal growth at pH 7.0. Extra-cellular subtilopeptidase is produced under submerged conditions, incubating for 96h at 30°C. The pH optimum for enzyme activity is between 6.0 and 7.0 at 30°C.

Resumo***

Produção de subtilopeptidase por uma linhagem de Bacillus subtilis

Entre 191 microrganismos isolados do ar, "retting liquor", solo, carne e pele (couro cru?), verificou-se que uma linhagem de *Bacillus subtilis* era bastante ativa na produção de subtilopeptidase. Amido e fosfato de amônia eram as melhores fontes de carbono e nitrogênio para a produção da exoenzima. Entre os sub-produtos e resíduos agrícolas examinados, o melâço de cana-de-açúcar como fonte de carbono proporcionou maior atividade, enquanto que o precipitado da água de maceração do milho ou glúten foi a melhor fonte de nitrogênio. O magnésio mostrou efeito estimulador na produção da exoprotease. O microrganismo apresenta crescimento ótimo em pH 7,0. A subtilopeptidase extracelular é produzida em condições de cultivo submerso, incubando-se durante 96 horas a 30°C. O pH ótimo de atividade da enzima está entre 6,0 e 7,0, a 30°C.

Introduction

Many proteolytic enzymes obtained from plant, animal or microbial sources are unsuitable for industrial uses as additives in soap powders, either due to the presence of inhibitory ingredients, or to the unsuitable pH for their optimum activity. Recently, proteases from microbial origin have assumed considerable industrial importance because they are extensively used in many industries such as enzymatic laundering, baking, fish, meat, leather, silk and wool industries, pharmaceutical products and in medical treatment of burns and ulcers.

In A.R.E. the leather industry constitutes one of the largest and most diversified industries. The leather industry in A.R.E. consumed large quantities of animal skins, in producing about 20 million square feet of light leather and 5 million square feet of heavy leather.

Bacterial exo-protease is extensively used in the preparation of the dehaired skins and hides for tanning, either in alkali or acid media. It is used in box calf, clothing, softy, fancy gloving and all types of leather.

The purpose of this study was to investigate: (a) isolation of local strain for proteolytic enzymes production, (b) factors affecting the fermentation, and (c) the utilization of agricultural byproducts produced locally in large quantities for bacterial exo-protease production.

Material and Methods

Isolation of aerobic sporeformers — Appropriate dilutions of the sample were pasteurized at 80°C for 20 min., then cooled rapidly. After well shaking, plating was carried out on nutrient agar medium. The

* Microbiology Dept., Agriculture Research Centre, Giza, Egypt, ARE.

** Microbiology Dept., Faculty of Agriculture, Ain Shams University, Egypt, ARE.

*** Resumo produzido pelo revisor.

most dominant bacteria appearing on plates were isolated and purified by streaking technique. The bacterial isolates were preliminarily identified microscopically as Gram-positive sporeforming rods.

Screening for proteolytic strains — The following procedure was used (4): cultures were streaked on a plate of nutrient agar containing 0.4% of gelatin. After the growth the colonies were flooded with 8–10ml of a solution of 15g of HgCl₂ in 100ml of distilled water and 20ml of concentrated HCl. This reagent forms a white opaque precipitate with unchanged gelatin but a liquefier is surrounded by a clear zone.

Identification of aerobic sporeformers — The most active enzyme producer isolate was identified as *Bacillus subtilis* according to Gordon, Haynes & Pang (4). The following tests were carried out:

Gram-positive rod, sporangia not definitely swollen, unstained globules not demonstrable in protoplasm of lightly stained cells grown on glucose agar, growth in 7% NaCl, acid not produced in litmus milk, acetyl-methylcarbinol produced, starch hydrolyzed, nitrates reduced to nitrites, and aerobic growth.

Maintenance of culture — Stock cultures were maintained on nutrient agar after incubation at 30°C for 48 hour. Cultures were kept in the refrigerator.

Culture conditions — Fermentation was carried out in 250ml cotton plugged Erlenmeyer flasks, each containing 50ml of the medium. The basal medium of Hagiwari (1) was used. It contained 8% potato starch, 0.1 M ammonium phosphate (0.27N%), ethanol 1.5%, sodium citrate 0.035M, potassium chloride 0.02M, magnesium sulfate septahydrate 0.02M and corn steep liquor 0.3%. Other carbon and nitrogen sources equivalent to 3% carbon and 0.27% nitrogen were added instead of potato starch and ammonium phosphate. Temperature of fermentation was kept at 30°C. One percent of a 24 hour old vegetative inoculum was used in the experiments. Fermentation flasks were incubated on a reciprocal shaker (20 strokes per minute). Enzyme analyses were made after 96 hour, or as otherwise stated.

Carbon and nitrogen sources — To investigate different carbon and nitrogen sources, the potato starch (38%C) and ammonium phosphate (23%N) were substituted by one of the following carbon and nitrogen sources, in each case obtaining levels of 3% and 0.27% respectively.

The following carbon sources were tested: soluble potato starch, dextrin, maltose, sucrose, glucose, rice bran, corn starch and cane sugar molasses.

The following nitrogen sources were tested: ammonium phosphate, peptone, tryptone, yeast extract, proteosepeptone, urea, casein, gluten, gelatin, dried soluble distiller yeast, corn steep liquor and corn steep precipitate.

Enzyme assay — Proteolytic activity was determined

by the method of Lohlein Volhard (5). A protease unit (LV) is the amount of enzyme that will catalyze, under the assay conditions described, the digestion of 1.725mg casein in one hour at 40°C.

Results

Strain

Using different sources, several trials for isolating aerobic sporeformers producing subtilopeptidase (extracellular neutral protease) were carried out. These sources were air, retting liquor, soil, hides and meat. The isolated organisms [191] were screened, searching for proteolytic strains on gelatin agar, recommended by Gordon & col. (4). Successful cultures [12] were grown on Hagiwari medium (1). Results in Table 1 showed the successful cultures with proteolytic activity ranged between 200 and 640 LV/ml. Isolate No. H-6 gave the highest activity. The most active isolate (*B. subtilis* H-6) was identified according to Gordon & col. (4).

Table 1

Proteolytic activity of the most active strains of aerobic sporeformers

Strain No:	gelatin agar cleared zones (mm)	Enzyme activity (LV/ml)
H-1	23	250
H-2	22	200
H-3	23	230
H-4	23	220
H-5	24	260
H-6	26	640
H-7	25	490
H-8	25	410
M-1	23	610
M-2	21	530
M-3	18	400
M-4	19	420

Carbon and nitrogen sources

The nutrition of all cells supports two functions: the generation of energy and the synthesis of protoplasm. The environment in which the organisms grows must supply the elements in a form available to the cell. The above mentioned two functions depend on a complex network of chemical reactions brought about by specific enzymes in a continuous process in every living organisms. An increase in the number of molecules of each essential enzyme must clearly take place whenever the quantities of living increase during growth. But even when growth is not taking place, a continuous synthesis is needed to replace the enzyme molecules which have undergone destruction. The formation of enzyme usually takes place within living cells and is influenced by the environment or

composition of the medium surrounding the cells (6). Thus the constituents of the fermented media markedly influence the yield of the desired endproducts. The two main nutritional sources, i.e. carbon and nitrogen providing these requirements, were studied. Different carbon and nitrogen sources were tried as shown in Tables 2a and 2b.

Table 2 a
Effect of carbon sources

C- sources*	LV/ml
Potato starch	830
Dextrin	710
Maltose	525
Sucrose	620
Glucose	625

* Basal medium: Ammonium phosphate 0.1M, ethanol 1.5%, Na citrate 0.035M, K chloride 0.02M, Mg sulfate 0.02M and CSL 0.3%.

Table 2 b
Effect of nitrogen sources

N- sources*	LV/ml
Ammonium phosphate	870
Peptone	650
Tryptone	560
Yeast extract	500
Proteosepeptone	625

* Basal medium: Potato starch 8%, ethanol 1.5%, Na citrate 0.035M, K chloride 0.02M, Mg sulfate 0.02M and CSL 0.3%.

Agricultural byproducts and wastes

The economics of enzyme fermentations limit the carbon and nitrogen sources to cheap or least expensive industrial materials. For the enzyme fermentation these sources would probably be agricultural byproduct and wastes of little or no other utility, e.g. rice bran, corn starch, cane sugar molasses, gluten, corn steep precipitate, dried distiller yeast and corn steep liquor. These materials are of the main by-products of agricultural industries in A.R.E. About 1,000,000 tons of rice bran and 150,000 tons of sugar cane molasses are produced in A.R.E. per annum. Results in Table 3 indicate that soluble starch gave the best and maximum yield of protease being 1150 LV/ml. The protease activity reached 1050 LV/ml when cane sugar molasses was used, followed by rice bran and corn starch.

Table 3 a

Utilization of agricultural byproducts for protease production

Agric. byproduct*	Enzyme activity (LV/ml)
<i>Carbon source:</i>	
Rice bran (18% C)	750
Corn starch (36% C)	600
Soluble starch (36% C)	1150
Cane sugar molasses (25% C)	1050

* Basal medium consists of 0.1M ammonium phosphate, 1.5% ethanol, 0.035M Na citrate, 0.020M K chloride, 0.02M Mg sulfate and 0.3% corn steep liquor.

Table 3 b

Utilization of agricultural byproducts as nitrogen sources for protease production

Agric. byproduct*	Enzyme activity (LV/ml)
<i>Nitrogen source:</i>	
Urea (46.5% N)	150
Casein (15% N)	750
Gluten (9% N)	1000
Gelatin (12% N)	450
Dried soluble distiller yeast (9% N)	600
Corn steep liquor (4% N)	1150
Corn steep ppt (8% N)	1340

* Basal medium consists of 8% soluble starch, 1.5 ethanol, 0.035M Na citrate, 0.02M K chloride, 0.02M Mg sulfate and 0.3% corn steep liquor.

Using sugar cane molasses as C-source at concentrations of 6, 8, 10 and 12% (equal to 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0% carbon), results showed that a concentration of 10% (2.5% C) gave the highest activity, being 1.250 LV/ml.

Corn steep precipitate as nitrogen source gave the best enzyme activity (1340 LV/ml), followed by corn steep liquor (1150 LV/ml) and gluten (1000 LV/ml). The reason for such results could be due to the chemical constitution of these nitrogen sources, and the presence of growth factors which stimulate the formation of subtilopeptidase.

Regarding the nitrogen concentrations, using gluten as a sole nitrogen source, it was found that 0.27% N, was the best concentration for protease production. Above or below this level a decrease in activity was observed.

Trace elements

It is generally considered that no metal with an atomic number higher than 55 is known to activate enzymes by itself (3). Thus the atomic number of metals used in this investigation were Ca^{++} [20], Mg^{++} [12], K^{+} [19], zinc [30] and ferric [26]. All the metals listed above have atomic numbers between 12 and 30 and do not exceed 55. Probably one of the important factors which control metal ion-activation of enzymes, is the size of the ion. The metal ions listed above all have radii which lie within a fairly narrow zone, in the middle range of observed atomic radii. Some investigators (2, 3) have shown that no metal ion with a radius below 0.34 or above than 1.65 Å is known to activate enzymes. It is noteworthy that the metals used in this experiment have radii which lie between the rather narrow limits of 0.78 and 1.03 Å.

Calcium, Mg^{++} , Zn^{++} , Fe^{+++} and potassium ions were chosen with regard to their activities on account of their atomic number and ionic radii. Each was used as shown in Table 4. Highest activity was recorded when a combination of Mg^{++} and K^+ was used. Other trace elements exerted nearly the same effect. On the other hand addition of Fe^{++} reduced enzyme activity.

Table 4

Effect of some trace elements on the production of protease

Trace element*	Concentration M	LV/ml
Calcium	0.02	714
Magnesium	0.02	710
Potassium	0.02	714
Zinc	0.0001	725
Ferric	0.0001	350
$Mg^{++} + K^+$	as above	830

* Basal medium consists of 0.1M $(NH_4)_2HPO_4$, 8% soluble starch, 1.5% ethanol, 0.035 Na citrate, and corn steep liquor 0.3 per cent.

The local isolate of *Bacillus subtilis* has its optimum growth at pH value 7.0. Neutral extra-cellular subtilopeptidase is produced from this strain by cultivation under submerged conditions for 96 hours at 30°C. Further work is under way for purifying the enzyme, and for studying its stability and physicochemical properties.

References

1. ARIMA, K. — Microbial enzyme production. Global Impacts of Appl. Microbiol., John Wiley, New York, 1964.
2. DIXON, M. & WEBB, E. C. — Enzymes, 2nd ed., Spottiswoode, Ballantyne & Co. LTD., London, 1964.
3. GLASSTONE, S. — Text Book of Physical Chemistry, Macmillan and Co. LTD, London, 1940.
4. GORDON, E. R.; HAYNES, W. C. & PANG, C. HOV-NAY. The Genus *Bacillus*, Agric. Handbook No 427, Washington, 1973.
5. LOHLEIN VOLHARD — Modified Lohlein Volhard method, Novo Industri A/S, Copenhagen, Denmark, 1967.
6. UMBEREIT, W. W. — Advance Applied Microbiology vol. 6, Academic Press, New York and London, 1964.

Ação da griseofulvina sobre a composição da parede celular em *Pycnoporus sanguineus**

Mioco F. Gomes** & Sonia M.C. Dietrich***

Résumo

A análise comparativa da parede celular do basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus*, crescido em presença e ausência de griseofulvina, mostrou que na presença do antibiótico a parede celular apresenta um glucano com maior labilidade ao ácido clorídrico, menor afinidade por enzimas hidrolíticas de polissacarídeos e maior consumo de periodato por resíduo de açúcar. Os dados sugerem que a ação da griseofulvina resulta na alteração do tipo de ligação glicosídica de glucano na parede celular, ou no aumento de um glucano já existente, com essas características.

Summary

Effect of griseofulvin on cell wall composition of Pycnoporus sanguineus

In the presence of griseofulvin, the wood-rotter polypore *Pycnoporus sanguineus* forms a cell wall glucan with increased sensitivity to HCl hydrolysis, low affinity for polysaccharidases and relatively high consumption of periodate upon oxidation. Results suggest that the antibiotic promotes alterations on the structure of cell wall glucans or causes the enrichment of an already existing glucan with the above characteristics.

Introdução

Griseofulvina (7-cloro-2', 4, 6-trimetoxi-6'-metil-2'-grisen-3, 4'-dional), um produto metabólico de *Penicillium griseofulvum* Dieck., é um antimicótico que, em baixas concentrações, provoca parada de crescimento, enrolamento e ramificação excessiva dos tubos germinativos e hifas em numerosos fungos (6, 7, 13).

Visto que os fungos mais sensíveis ao antibiótico possuem parede quitinosa foi sugerido que a ação da griseofulvina estaria direta ou indiretamente relacionada com a parede celular (5). Entretanto, foi posteriormente verificado, em *Trichophyton mentagrophytes*, que não há alteração na composição da parede, nem acúmulo de nucleotídeos precursores da síntese de quitina ou outros elementos de parede, sob a ação do antibiótico (12). Além disso, outros autores verificaram alterações no conteúdo de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) pela ação da griseofulvina (13, 14, 15). Para uns há aumento no conteúdo desses compostos (14) e para outros redução (11).

O objetivo do trabalho foi investigar a ação da griseofulvina sobre a parede celular de fungo, pelo fato desse antimicótico causar alteração na forma e ramificações das hifas, ou seja, sobre a morfologia, intimamente relacionada à composição e estrutura da parede celular (3).

Materiais e Métodos

Antibiótico — A griseofulvina micro-cristalina foi gentilmente cedida pelos laboratórios Johnson & Johnson do Brasil. A caracterização e determinação do grau de pureza do antibiótico foram feitas por análise do espectro de absorção ao ultra-violeta e cromatografia em camada delgada, segundo a técnica descrita nos Annales de Pharmacie Française (1), indicando o grau de pureza de 99%.

Organismo — *Pycnoporus sanguineus* L. (ex Fries) Murrill, basidiomiceto destruidor de madeira, mantido na coleção de culturas do Instituto de Botânica (SPC 8), foi cultivado em placas de Petri contendo o meio batata-

*Trabalho realizado no Instituto de Botânica de São Paulo, com auxílio da FAPESP e do CNPq. Parte de tese de mestrado apresentada por M.F. Gomes ao Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

**Endereço atual: Departamento de Biologia CCEM, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.

***Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01000 São Paulo, SP (endereço para correspondência).

dextrose-agar (Difco). Espécime da cultura foi enviado ao American type culture collection onde se encontra registrado como *Polyporus sanguineus* (ATCC 24598).

Reagentes e padrões — glicose, glicosamina, N-acetil glicosamina, celobiase, gentiobiase e quitina foram obtidos da Sigma Co. (E.U.A.); laminarina e celulose foram adquiridos da Koch Light (Inglaterra).

Crescimento e determinação de peso seco total — Os inóculos foram obtidos de culturas em desenvolvimento em meio sólido, com um furador de rolhas, esterilizado, de 5mm de diâmetro. Os inóculos eram colocados em meio de cultura sólido ou líquido, contendo 1% de extrato de malte (Difco). No meio, eram colocadas concentrações crescentes de solução estoque de griseofulvina dissolvida em acetona. Os controles foram feitos acrescentando-se ao meio quantidades de acetona iguais às dos tratados.

Dos fungos crescidos em meio sólido tomaram-se medidas diárias do diâmetro das colônias até que as mesmas atingissem os bordos da placa. Micélios crescidos em meio líquido (Erlenmeyers de 250ml de capacidade, com 100ml de meio) eram coletados por centrifugação, após uma semana de crescimento, e lavados três vezes com água destilada, por centrifugação a 500xg, a 5°C. Os micélios, eram transferidos para frascos previamente pesados e, em seguida, liofilizados, determinando-se o peso seco. Amostras dos inóculos iniciais eram também lavadas, secas, e pesadas da mesma maneira, sendo esse peso subtraído do peso seco dos micélios.

Tanto no crescimento em meio líquido, como em meio sólido, o fungo foi mantido a 22°C, no escuro.

Extração e determinação do peso das paredes — Foi feito o crescimento em larga escala (3 litros) em meio líquido, contendo a concentração de griseofulvina que inibiu 50% do crescimento, no experimento anterior (Fig. 1), ou seja, 15µg/ml. O controle foi feito em volume igual, contendo quantidade equivalente de acetona. Os micélios eram coletados, lavados e triturados em homogeneizador VirTis (modelo S "45") a 5°C. O homogeneizado era submetido a ultra-som (insonator mod 500, 20KHz), por 5 minutos intermitentes, centrifugado a frio e o precipitado novamente submetido a ultra-som, até a quebra total da parede (10). O tempo total de tratamento ao ultra-som foi o mesmo para todos os micélios. Os precipitados assim obtidos (parede celular) eram colocados em tubos, previamente pesados, e secos em dessecador até atingirem peso constante. Alternativamente, a parede foi extraída com 5% NaOH em metanol a 80%, a quente, até eliminação total do material citoplasmático (2).

Determinação de açúcar total — A determinação de açúcar total da parede celular, foi feita pelo método de antrona (20). Aliquotas de parede seca (10mg) eram

suspensas em água por tratamento a ultra-som, e porções da suspensão rapidamente pipetadas para tubos de ensaio, aos quais se adicionava o reagente de antrona.

Determinação de produtos de hidrólise ácida — As paredes foram submetidas à hidrólise ácida, com várias concentrações de HCl, em ampolas fechadas, e mantidas a 100°C, por 5 horas. Como a porcentagem de hidrólise foi mais alta com HCl 0,5N, foi feita também a cinética de hidrólise com esta concentração de ácido. Amostras desses hidrolisados eram secas, até eliminação de todo o HCl (9), para as determinações colorimétricas subsequentes.

A determinação de açúcar redutor dos hidrolisados foi feita pelo método de Somogyi-Nelson (16) e a de açúcares aminados pelo método de Morgan-Elson, modificado (4). A análise qualitativa dos açúcares redutores e aminados foi feita por cromatografia descendente em papel Whatman nº 1, usando-se o sistema de solventes: *n* butanol-piridina-água (6 : 4 : 3). Usou-se também eletroforese, para análise dos açúcares aminados. Os chromatogramas e eletroforetogramas eram revelados com nitroso de prata (19), no caso de detecção de açúcares redutores, e com nihidrina (solução 0,2% em acetona e aquecimento a 105°C, por 5 minutos), no caso de detecção de açúcares aminados.

Determinação de produtos de hidrólise enzimática — Utilizou-se tanto o extrato enzimático de suco gástrico do caracol *Strophocelylus paranaguensis* enriquecido em quitinase (9), como o extrato enzimático, obtido por purificação do exudado do fungo *Myrothecium verrucaria* ATCC 9095, segundo Selby & Maitland (17). As paredes mais as enzimas, em presença de tampão acetato 0,05M, pH 5,5, foram incubadas a 37°C até 72h. Foram coletadas alíquotas para determinação de açúcar redutor (16) e para cromatografia.

Oxidação com periodato — A oxidação da parede em amostras de 10mg, foi feita com periodato de sódio em presença de tampão acetado (18). Controles contendo apenas periodato e tampão e controles de oxidação de padrões foram também efetuados. A degradação foi levada a efeito no escuro, até 48h. Durante esse período, foram retiradas alíquotas e medida a absorção a 223nm, calculando-se a quantidade de periodato consumido.

Resultados

Ação da griseofulvina sobre o crescimento — A relação entre dose e efeito da griseofulvina sobre o crescimento de *P. sanguineus*, em meio sólido e líquido, está ilustrada na figura 1. O crescimento do fungo é inibido por griseofulvina, em concentrações a partir de 2,5µg/ml. Tanto em meio sólido, como em meio líquido, a concentra-

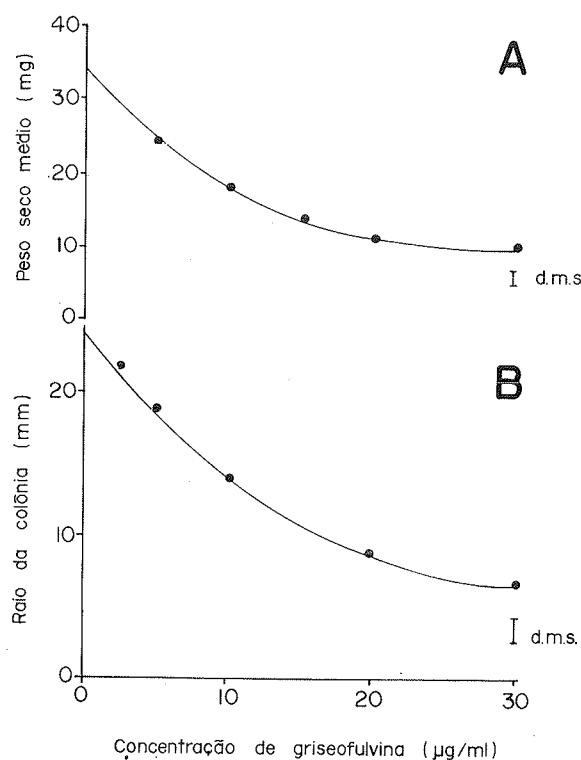


Fig. 1 — Ação de griseofulvina sobre o crescimento de *P. sanguineus* em meio líquido (A) e em meio sólido (B). Cada ponto representa a média de três determinações. d.m.s. = diferença mínima significativa

ção que inibe 50% o crescimento é ao redor de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Com essa concentração, já são observadas alterações morfológicas ("curling" e ramificação excessiva), citadas na literatura (5, 6, 7).

Ação da griseofulvina sobre a composição da parede celular — A parede celular dos micélios, tanto crescido na ausência como na presença de griseofulvina, constitui cerca de 10-15% do peso seco total do micélio. Tanto a parede do controle, como a do tratado com griseofulvina (na concentração que inibe cerca de 50% o crescimento do fungo), contém cerca de 55-60% de açúcares totais, determinado pelo método de antrona.

Hidrólise ácida — As porcentagens de hidrólise da parede celular, com diferentes concentrações de HCl estão apresentadas na tabela 1. A quantidade de hexosaminas liberadas é maior no tratado, hidrolisado a 5,0N. No entanto, a 6,0N, quando o máximo de hexosamina é liberado, não houve diferença entre a parede no controle e no tratado. A parede celular do fungo tratado apresenta quantidade significativamente maior de açúcar redutor liberado nas concentrações de 0,5 a 5,0N de HCl. Resultados semelhantes foram observados com paredes obtidas por extração com NaOH em metanol. A cinética de hidrólise indica maior liberação de açúcares redutores no controle, desde os primeiros minutos (Fig. 2). A análise dos produtos de hidrólise revelou que o tratamento

Tabela 1

Hidrólise ácida de parede celular de *P. sanguineus* crescido na ausência (controle) e na presença (tratado) de griseofulvina.

HCl (N)	Produtos formados (% de parede inicial) ^a			
	açúcar redutor ^b		hexosaminas ^b	
	controle	tratado	controle	tratado
0,25	27,0	27,0	—	—
0,5	35,0	37,8 ^c	—	—
2,0	29,7	31,5 ^c	—	—
5,0	31,5	35,1 ^c	8,1	9,8 ^c
6,0	—	—	16,1	15,2

^aMédia de seis determinações

^bAçúcar redutor calculado em equivalentes de glicose e hexosaminas em equivalentes de glicosamina

^cDiferenças significativas, $P = 0,05$

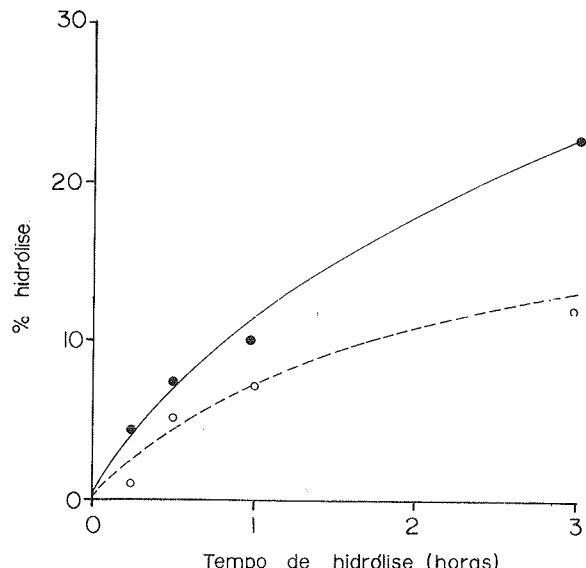


Fig. 2 — Cinética da hidrólise ácida da parede celular de *P. sanguineus* crescido na presença e ausência de griseofulvina. ● —● controle; ○ —○ tratado com griseofulvina (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

com griseofulvina não provoca o aparecimento de qualquer açúcar diferente, que pudesse ser detectado por cromatografia ou eletroforese em papel. Verificou-se, entretanto, maior liberação de glicose, nos tratados, indicando portanto, maior conteúdo ou maior labilidade de um glucano na parede celular.

Hidrólise enzimática — O extrato de *M. verrucaria* praticamente não age sobre as paredes de *P. sanguineus* tratados ou não por griseofulvina. Entretanto, tem ligeira ação sobre o controle (0,18% de hidrólise em 72 horas). Esse extrato enzimático age sobre celulose (2,5% de hidrólise), tem alta atividade sobre laminarina, um glucano com ligação β , 1 \rightarrow 3 (73% de hidrólise) e não tem atividade sobre quitina.

As enzimas do suco gástrico do caracol agem sobre as paredes do fungo, sendo mais ativas sobre o controle

(7,5%) do que sobre o tratado (5,0%). Tem também atividade elevada sobre a laminarina (30%).

Oxidação com periodato — O consumo teórico para glucanos de cada tipo de ligação β , e os dados obtidos, são apresentados na Tabela 2. A parede no tratado, consumiu o dobro do periodato consumido pelo controle. Isso sugere que a parede do fungo tratado com griseofulvina possui um glucano com ligações diferentes do glucano do controle, consumindo maior quantidade de periodato por mol de açúcar.

Tabela 2

Oxidação com periodato da parede celular de *P. sanguineus* obtida por crescimento na presença (tratado) e na ausência (controle) de griseofulvina

Compostos	consumo de periodato (moles/mol de resíduo de glicose)
Parede celular (controle)	0,21
Parede celular (tratado)	0,43
Padrões	
glicose	4,4
celobiose	2,1
Teórico	
glucano ($\beta, 1 \rightarrow 2$)	1,0
glucano ($\beta, 1 \rightarrow 3$)	0,0
glucano ($\beta, 1 \rightarrow 4$)	1,0
glucano ($\beta, 1 \rightarrow 6$)	2,0
Quitina	0,0

Discussão

Pycnoporus sanguineus tem seu crescimento inibido por concentrações crescentes de griseofulvina, a partir de 2,5 μ g/ml. A concentração que inibe 50% do crescimento, tanto em meio sólido quanto em meio líquido, é ao redor de 15 μ g/ml. Essa concentração é semelhante à observada por Brian (5), para inibição do crescimento de outros fungos pertencentes ao mesmo grupo (Basidiomycetes). A produção de parede celular não é alterada em relação ao controle, nos mesmos níveis em que o crescimento é inibido. Da mesma forma, a quantidade de hidratos de carbono totais das paredes controle e aquelas obtidas após tratamento com griseofulvina, não é alterada. As únicas diferenças observadas são a menor labilidade a enzimas digestivas do suco gástrico de caracol, além de maior produção de açúcar redutor por hidrólise com ácido clorídrico, em concentrações que vão

de 0,5 a 5,0N. Essas diferenças se manifestam tanto em paredes extraídas por tratamento com ultra-som como por tratamento com NaOH em metanol a quente. Na hidrólise ácida, não se observa o aparecimento de um novo açúcar e sim o aumento da quantidade de glicose formada. Isso sugere o aumento da quantidade ou da labilidade de um glucano de parede celular pela ação da griseofulvina. A glicosamina, proveniente da hidrólise de quitina, não é significativamente alterada. Isto explicaria as observações de Eveleigh & Knight (12) de que a griseofulvina não altera a composição, em polissacáideos, da parede celular em fungos quitinosos.

Segundo Bartnicki-Garcia (3), os basidiomicetos têm paredes formadas por quitina e glucanos, estes últimos com ligações $\beta, 1 \rightarrow 3$ e ramificações $\beta, 1 \rightarrow 6$. A labilidade dos β -glucanos à hidrolise ácida, segundo Capon (8) é, pela ordem crescente: ($\beta, 1 \rightarrow 6$), ($\beta, 1 \rightarrow 4$), ($\beta, 1 \rightarrow 3$) e ($\beta, 1 \rightarrow 2$). Os glucanos de ligação $\beta, 1 \rightarrow 3$ não consomem periodato, visto não possuírem hidroxilos em carbonos viscinais, o mesmo sucedendo com a quitina. Os glucanos que consomem maior quantidade de periodato são os de ligações $\beta, 1 \rightarrow 6$ e, em seguida, os $\beta, 1 \rightarrow 4$ e $\beta, 1 \rightarrow 2$. Assumindo-se que o glucano de *P. sanguineus* seja de ligações β , as possibilidades de alteração pela griseofulvina são: a) produção de um glucano mais labil que $\beta, 1 \rightarrow 3$ e que tenha maior consumo de periodato, ou seja $\beta, 1 \rightarrow 2$ glucano; b) aumento de um glucano já existente e que consuma periodato. Nesse caso, poderia ser o aumento na quantidade de ligações $\beta, 1 \rightarrow 6$, cujas unidades de glicose consomem mais periodato que as demais. Entretanto, a labilidade dos glucanos $\beta, 1 \rightarrow 6$ é menor entre os β -glucanos, e essa possibilidade seria, então, menos favorecida; c) formação ou aumento de um glucano com ligação α , mais labil que as ligações β (8), em posição compatível com o maior consumo de periodato.

Em qualquer das hipóteses, os resultados obtidos sugerem que a griseofulvina age sobre *P. sanguineus*, provocando alterações no tipo usual das ligações glicosídicas do glucano (ou glucanos) da parede celular. Essas alterações poderiam ser responsáveis pelas alterações morfológicas (enrolamento e aumento das ramificações) causadas pelo antimicótico.

Agradecimentos

As autoras agradecem as sugestões do Prof. C.P. Dietrich, durante a realização e redação do trabalho.

Referências Bibliográficas

- ANNALES PHARMACEUTIQUES FRANÇAISES — Griséofulvine. Vol. 27:693-695, 1969.
- ARONSON, J.A.; COOPER, B.A. & FULLER, M.S. — Glucans of Oomycetes cell walls. *Science*, 155:332-335, 1967.
- BARTNIČKI-GARCIA, S. — Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.*, 22:87-108, 1968.
- BLIX, G. — The determination of hexosamines according to Elson and Morgan. *Acta chem. Scand.*, 2:467-473, 1948.

5. BRIAN, P.W. — Studies on the biological activity of griseofulvin. *Ann. Bot. (N.S.)*, 13:59-77, 1949.
6. BRIAN, P.W.; CURTIS, P.J. & HEMMING, H.G. — A substance causing abnormal development of fungal hyphae produced by *Penicillium janczewskii* Zal. I-biological assay, production and isolation of "curling factor". *Trans. Brit. mycol. Soc.*, 29:173-187, 1946.
7. BRIAN, P.W.; CURTIS, P.J. & HEMMING, H.G. — A substance causing abnormal development of fungal hyphae produced by *Penicillium janczewskii* Zal. III — Identity of "curling factor" with griseofulvin. *Trans. Brit. mycol. Soc.*, 32:30-33, 1949.
8. CAPON, B. — Mechanism in carbohydrate chemistry. *Chem. Rev.*, 69:407-498, 1969.
9. DIETRICH, S.M.C. — Carbohydrates from the hyphal walls of some Oomycetes. *Biochim. biophys. Acta.*, 313:95-98, 1973.
10. DIETRICH, S.M.C. — Comparative study of hyphal wall components of Oomycetes: Saprolegniaceae and Pythiaceae. *An. Acad. brasil. Cienc.*, 47:155-162, 1975.
11. EL-NAKEEB, M.A.; MCLELLAN, W.L. & LAMPEN, J.O. — Antibiotic action of griseofulvin on dermatophytes. *J. Bacteriol.*, 89:557-563, 1965.
12. EVELEIGH, D.E. & KNIGHT, S.C. — The effect os griseofulvin on the cell wall composition of *Trichophyton mentagrophytes*. *Bacteriol. Proc.*, GB2:27, 1965.
13. GOTTLIEB, D. & SHAW, P.D. — Mechanism of action of antifugal antibiotics. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 8:371-402, 1970.
14. HUBER, F.M. — Griseofulvin. In: *Antibiotics* (Gottlieb, D. & Shaw, P.D., eds.), Springer-Verlag Inc. New York, Vol. 1 p. 181-189, 1967.
15. HUBER, F.M. & GOTTLIEB, D. — The mechanism of action of griseofulvin. *Can. J. Microbiol.*, 14:111-118, 1968.
16. NELSON, N. — A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. biol. Chem.*, 153:375-380, 1944.
17. SELBY, K. & MAITLAND, C.C. — The fractionation of *Myrothecium verrucaria* cellulase by gel filtration. *Biochem. J.*, 94: 578-583, 1965.
18. SPIRO, R.G. — Analysis of sugars found in glycoproteins. In: *Methods in Enzymology*. Vol. VIII (Neufeld, E.F. & Ginsburg, V., eds), Academic Press, N.Y. p. 3-52, 1966.
19. TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. — Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature (London)*, 166:444-445, 1950.
20. UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H. & STAUFFER, J.F. — *Manometric Techniques*. 4th ed. Minnesota, Burgess Publishing Co., 1964.

The influence of the host in the curing of a F'lac factor by acridine orange*

Maria Regina Fernandes de Toledo, Rosa Maria Silva,
Regina Gomes de Almeida & Luiz Rachid Trabulsi

Summary

The elimination of the F'lac plasmid, by acridine orange, was studied in specimens of *Escherichia*, *Shigella*, *Proteus* and *Salmonella*. The F'lac was eliminated from 97.87% and 94.05% of *Escherichia* and *Shigella* cells, respectively, but only from 10.16% of *Proteus* and 3.13% of *Salmonella* cells. The results indicate a strong influence of the host in plasmid elimination.

Resumo

Influência do hospedeiro na eliminação do fator F'lac pelo alaranjado de acridina

O alaranjado de acridina eliminou o plasmídio F'lac de 97,87% de linhagens de *Escherichia* e de 94,05% de *Shigella*, mas de apenas 10,16% de *Proteus* e 3,13% de *Salmonella*. Os resultados indicam a marcante influência do hospedeiro, na eliminação no plasmídio.

The curing of some genetic characteristics by acridine orange (A.O.) has been utilized as a plasmid evidence in enteric organisms (Watanabe, T. & Fukasawa, T., *J. Bact.*, 81:679-683, 1961; Watanabe, T., *New Eng. J. Med.*, 275:888-894, 1966) and other bacteria. However, very little attention has been given to the role of the host in the process of curing. In this note are presented the results of experiments in which we tried to eliminate by acridine orange, a F'lac plasmid introduced in strains of the genera *Escherichia*, *Shigella*, *Proteus* and *Salmonella*. It is shown in Table 1 that F'lac was eliminated from 97.87% and 94.05% of *Escherichia* and *Shigella* cells, respectively, but only from 10.16% of

Proteus and 3.13% of *Salmonella* cells. To exclude chromosomal integration (Hirota, Y., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, USA, 46:57-64, 1960) or an eventual modification of F'lac by *Proteus* and *Salmonella*, which would prevent elimination, the plasmid was re-transferred from these bacteria to *E. coli* K12 and the curing experiments were repeated. As before, the plasmid was eliminated in a frequency similar to that one found in *Escherichia* (Table 2). The present results point to a strong influence of the host in the elimination of its plasmids by acridine orange. This fact should be taken into consideration whenever curing experiments are performed to indicate the presence of plasmids in enteric organisms.

Table 1
Elimination of F'lac from *Escherichia*, *Shigella*, *Proteus* and *Salmonella* by acridine orange (A.O.)

Strains with F'lac		% F'lac elimination		Strains with F'lac		% F'lac elimination	
		Spontaneous	A.O.			Spontaneous	A.O.
<i>E. coli</i> 0152	T 10	3.28	93.83	<i>P. mirabilis</i>	86	14.68	28.45
<i>E. coli</i> 0152	T 15	7.16	99.09	<i>P. mirabilis</i>	13	2.68	6.92
<i>E. coli</i> 0136	T 2	10.81	100.00	<i>P. mirabilis</i>	41	7.49	10.85
<i>E. coli</i> 0136	T 4	0.55	97.66	<i>P. rettgeri</i>	23	0.00	0.92
<i>E. coli</i> 032	T 65	1.09	98.78	<i>P. vulgaris</i>	15	4.62	3.65
average		4.58	97.87	average		5.89	10.16
<i>Sh. dysenteriae</i>	49	0.00	99.36	<i>S. typhimurium</i>	12	0.18	0.28
<i>Sh. flexneri</i>	139	0.00	74.63	<i>S. typhimurium</i>	107	3.98	3.66
<i>Sh. flexneri</i>	140	6.62	97.92	<i>S. derby</i>	102	7.84	8.37
<i>Sh. flexneri</i>	309	2.34	99.47	<i>S. brednay</i>	111	1.49	2.45
<i>Sh. boydii</i>	145	0.18	98.89	<i>S. grumpensis</i>	21	0.58	0.89
average		1.83	94.05	average		2.81	3.13

*Disciplina de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu 862, 3º andar, 04023 São Paulo, SP.

Table 2

* Elimination of F' lac from *E. coli* K₁₂, after re-transfer from *Proteus* and *Salmonella*, by acridine orange (A.O.)

<i>E. coli</i> K ₁₂ with F' lac from		% F' lac elimination	
		Spontaneous	A.O.
<i>P. mirabilis</i>	86	0.95	99.5
<i>P. mirabilis</i>	13	0.34	99.8
<i>P. mirabilis</i>	41	0.44	97.6
<i>P. rettgeri</i>	23	0.17	99.8
<i>P. vulgaris</i>	15	2.13	99.5
	average	0.80	99.2
<i>S. typhimurium</i>	12	0.05	52.9
<i>S. typhimurium</i>	107	2.70	99.9
<i>S. derby</i>	102	2.49	99.6
<i>S. brednay</i>	111	1.03	98.4
<i>S. grumpensis</i>	21	0.50	99.8
	average	1.35	90.1

Amostras de *Escherichia coli*, de origem animal, produtoras de enterotoxina termoestável (ST) isoladas de casos de diarréia em São Paulo, SP, Brasil*

Margaretti Simões**, Marlene B. Serafim***,
Angela C. Rodrigues***, Waldyr Giorgi****; Luiz Pustiglione Netto***** e
A.F. Pestana de Castro***

Resumo

Ocorrência de 2 amostras de *Escherichia coli*, entre 61 isoladas de bovinos e suínos, produzindo unicamente enterotoxina termoestável (ST), revelada pelo teste do camundongo recém-nascido. Não foi observada a produção de enterotoxina termolábil (LT) nas amostras ST-positivas.

Summary

Heat-stable enterotoxin-producing strains of E. coli of animal origin isolated from cases of diarrhea in São Paulo State, Brazil

Occurrence of two strains of *Escherichia coli*, among 61 isolated from bovines and swines, producing only heat-stable enterotoxin (ST) revealed by the infant mouse test. No production of heat-labile (LT) enterotoxin was detected in the ST-positive strains.

Recentemente, foram isoladas em Campinas, de diarréias em crianças, amostras de *Escherichia coli* produtoras de enterotoxina termoestável (ST) (Serafim, M.B. & col. *Rev. Inst. Med. trop.*, no prelo). Concomitantemente, em São Paulo, várias amostras deste microrganismo, isoladas de adultos e crianças, demonstraram produzir, isoladamente ou em conjunto, enterotoxinas termolábil (LT) e termoestável (Giugliano, L.G., 1976, Tese Mestrado, Escola Paulista de Medicina). Na identificação das amostras enterotoxigênicas, produtoras de ST e LT, foram usados, respectivamente, o teste do camundongo recém-nascido (Dean, A.G. & col. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1972) e cultivos celulares da linhagem Y1 derivada de tumor de adrenal de camundongo (Donta, S.T. & col. *Science*, 183:334-335, 1974).

Na presente comunicação, relata-se a ocorrência, em São Paulo, de duas amostras de *E. coli*, de origem animal, produtoras de enterotoxina termoestável, isoladas de casos de diarréia em bovinos e suínos. Foram

examinadas 61 amostras de *E. coli* isoladas de casos de diarréia, sendo 28 originárias de suínos; 14 de bovinos; 4 de eqüinos; 3 de coelhos e 12 de diversos animais, alguns silvestres, como cangurus, macacos, veados e camelos.

Os microrganismos foram identificados bioquimicamente, de acordo com o recomendado por Edwards & Ewing (*Identification of Enterobacteriaceae* 3 ed. Burgess-Publishing Company – 1972).

As amostras de *E. coli* foram primeiramente cultivadas em caldo nutritivo, a 37°C, por 18 horas. A partir destes cultivos, foram semeadas em Erlemeyers de 500ml contendo 25ml de meio de Evans (Evans, D.J. & col., *Infect. & Immun.*, 8:725-735, 1973).

Após incubação com agitação, às culturas foram centrifugadas a 8000rpm por 30 minutos. Os sobredentantes, cuidadosamente coletados, foram examinados, quanto à presença de ST, pelo teste do camundongo recém-nascido, considerando-se como

*Trabalho realizado com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, auxílio nº 2222-0732/75.

**Dep. Microbiologia Escola Paulista de Medicina-Bolsista da FAPESP.

***Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas.

****Seção de Bovinos, Ovinos e Caprinos do Instituto Biológico de São Paulo.

*****Divisão de Patologia Animal Especial do Instituto Biológico de São Paulo.

positivas as amostras cujos valores para a relação peso dos intestinos/peso das carcaças fosse superior a 0,085.

As amostras que produziram ST foram também investigadas quanto à produção de enterotoxina LT, através do aumento da permeabilidade capilar (Evans, D.J. & col. *Infect. & Immun.* 8:725-735, 1973) e da alteração morfológica em células da linhagem Y₁, de tumor de adrenal de camundongo.

Apenas duas entre 61 amostras de *E. coli*, forneceram relações entre peso dos intestinos/peso das carcaças superiores a 0,085. A presença de intestinos dilatados e cheios de líquido foi característica das amostras positivas. Estas, IB 2600 e IB 1340, isoladas respectivamente de suíno e bovino, produziram, em repetidos testes, valores médios de 0,124 e 0,095. Três amostras apresentaram valores compreendidos entre 0,070 e 0,075 e poderiam ser consideradas como suspeitas.

Filtrado das amostras produtoras de ST, examinados em cultura de tecido da linhagem Y₁, não produziram arredondamento, nem foram capazes de

provocar, mesmo em preparados concentrados, induimento e aumento da permeabilidade capilar na pele de coelhos, do que se deduz não ter havido produção de enterotoxina termolábil.

Com relação às amostras de origem animal, não existe, na literatura nacional, nenhum relato sobre a ocorrência de *E. coli* enterotoxigênica. Considerando-se que nesta investigação apenas duas, entre 61 amostras de *E. coli*, isoladas de animais, foram capazes de produzir enterotoxina do tipo ST, pode-se sugerir que esta não desempenhe papel importante na etiologia das diarréias entre animais.

É conveniente lembrar, todavia, que muitos dos casos de diarréia examinados poderiam ser de natureza não infecciosa.

Outro aspecto é que, em nossa metodologia, somente amostras produtoras de enterotoxina do tipo ST foram examinadas, quanto à produção de enterotoxina termolábil, sendo possível que alguns destes casos de diarréia tenham sido provocados por amostras que produzissem exclusivamente enterotoxina do tipo LT.

**Frequency of *E. coli* 0136 and 0152 in faeces of children and adults
living in the Recife area, Pernambuco, Brasil**

Diva Montenegro Melo*, Maria Regina Fernandes de Toledo** & Luiz Rachid Trabulsi**

At present about ten antigenic types of invasive *E. coli* are known, including those belonging to 0136 and 0152 serotypes. The invasiveness of these two serotypes was first shown by Trabulsi in 1964 who called them strains 193T and 185T (Trabulsi, L.R., *Rev. Inst. Med. trop.* São Paulo, 7:16-23, 1965 and Trabulsi, L.R.; Zuliani, M.E. & Serrano, J.A., *Rev. Inst. Med. trop.* São Paulo, 7:241-246, 1965). Later on, it was shown that strain 185T was a new *E. coli* antigenic O group (Trabulsi, L.R.; Fernandes, M.R.F. & Zuliani, M.E., *Rev. Inst. Med. trop.* São Paulo, 9:31-39, 1967) and that strain 193T was antigenically identical to *E. coli* 0136 (Fernandes, M.R.F. & Trabulsi, L.R., *Rev. Inst. Med. trop.* São Paulo, 11:101-103, 1969), described by Sakasaki & Namioka in Japan (Sakasaki, R. & Namioka, S., *Japan. J. Exp. Med.*, 27:411-416, 1957). Due to a mistake at the International Escherichia Center, in Copenhagen, strain 185T was classified as *E. coli* 0115 (Trabulsi, L.R. & Toledo, M.R.F., *Rev. Inst. Med. trop.* São Paulo, 11:358-362, 1969). However, recently, Stenzel showed that strain 185T was identical to *E. coli* 0152, an antigenic group characterized by Ørskov & col. in 1972 (Ørskov, F.; Ørskov, I. & Furowicz, A.J., *Acta path. microbiol. scand.*, 80:435-440, 1972). The very few data on the frequency of invasive *E. coli* in individuals with gastrointestinal disturbances prompted us to publish this note in which we present the results of the search of *E. coli* 0136 e 0152 in 5588 individuals whose faeces were cultured in the laboratory of one of us (Diva M. Melo). The faeces were directly cultured in Teague and SS Agar and in SS Agar after enrichment in tetrathionate broth. *E. coli* 0136 and 0152 were identified as described by Trabulsi & col. (Trabulsi, L.R.; Fernandes, M.R.F. & Zuliani, M.E., *Rev. Inst. Med. trop.* São Paulo, 9:31-39, 1967)

and *Salmonella* and *Shigella* in accordance with Edwards & Ewing (Edwards, P.R. & Ewing, W.H., *Identification of Enterobacteriaceae*. 3 ed. Burgess-Publishing Company, 1972). Approximately 100 strains to the two bacteria were inoculated in the guinea-pig eye and all of them caused a typical keratoconjunctivitis. It is shown in Table I that *E. coli* 0136 was found in 53 individuals (28 adults and 25 children) and *E. coli* 0152 in 107 (48 adults and 59 children). Therefore, the two bacteria, were found in 160 individuals (2,86% of the cases). *Salmonella* was found in 274 cases (4,90%) and *Shigella* in 307 ones (5,49%). The rather low frequency of *Shigella*, *Salmonella* and of the two invasive *E. coli* may be due to the inclusion of faeces from many individuals without diarrhea. However, the present results show that *E. coli* 0136 and 0152 are relatively frequent and stress the need to look for invasive *E. coli* in routine faeces culture.

Tabela 1

Frequency of *E. coli* 0136 and 0152 in faeces of children
and adults living in the Recife area, Pernambuco

Individuals	Nº	%
With <i>E. coli</i> 0136	53	0.95
With <i>E. coli</i> 0152	107	1.91
With <i>Salmonella</i>	274	4.90
With <i>Shigella</i>	307	5.49
Without any of the above bacteria	4,847	86.74
Total	5,588	99.99

* Hospital das Clínicas — Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, 50000 Recife, PE.

** Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu 862, 3º andar, 04023 São Paulo, SP

Volume 8 , Número 1 — Janeiro/Março, 1977

Artigos originais

Comportamento nuclear no heterobasidiomiceto <i>Filobasidium floriforme</i> [Nuclear behavior in the heterobasidiomycetes <i>Filobasidium floriforme</i>] — João S. Furtado	1
Linhagem rara de <i>Escherichia coli</i> indol-negativa e produtora de H ₂ S [Unusual strain of indol-negative and H ₂ S-producing <i>Escherichia coli</i> .] — Marcelo Magalhães & Adelma Véras	7
Isolamento do vírus da mamilite herpética bovina no Brasil [Isolation of bovine herpes mamillitis virus in Brazil] — Fúlvio José Alice	9
Efficacy of some simple methods for long-term preservation of bacterial cultures — I. Suassuna, Ivone R. Suassuna, I. D. Ricciardi & L.C.D. Formiga	15
Ocorrência de esporocistos de <i>Sarcocystis</i> sp. em cães na cidade de São Paulo [Incidence of sporocysts of <i>Sarcocystis</i> sp. in dog of the city of São Paulo] — Saemi Ogassawara, Carlos Eduardo Larsson, Maria Helena M. A. Larsson, Mitika K. Hagiwara & Guacira Gouveia	20
Atividade "in vitro" da sisomicina contra amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , enterobactérias e de outras espécies bacterianas resistentes e sensíveis à gentamicina ["In vitro" activity of sisomicin against strains of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , several enterobacteria and other bacterial species both resistant and susceptible to gentamicin] — Laurinda A. Soares & Luiz R. Trabulsi	23

Volume 8, Número 2 — Abril/Junho, 1977

Artigos originais

Acumulações limosas na indústria de chapas de fibras de madeira: I. Natureza da flora microbiana [Slime accumulations in fiberboard industries. I. Nature of microbial population] — Augusto Ferreira da Eira, Paulo de Campos Torres de Carvalho, José Santo Goldoni & Eneida de Assumpção	31
Relative heterothallism in <i>Aspergillus nidulans</i> — I. R. Baracho & J. L. Azevendo	36
Isolation and identification of menaquinone and acylglycerols in the acetone-soluble lipids from <i>Nocardia rhodochrous</i> — Celio Lopes Silva & Thuioshi Ioneda	39
Dupla redutase na determinação da verdadeira qualidade do leite de consumo [Double reductase in the determination of the real milk quality] — Alexandre Mello Filho, Jair Agostineti Gentilin, Antônio José Xavier & Luiz Celso de Castro	43
Relacionamento antigênico entre <i>Yersinia pestis</i> e outras enterobactérias [Non-reciprocal relationships between <i>Yersinia pestis</i> and other enterobacteria] — Marly Paiva, Ítalo Suassuna & Ivone Rocco Suassuna	46

Nota breve

Fixação e coloração de flagelados do gênero <i>Tritrichomonas</i> [Fixation and staining of flagellate cells of <i>Tritrichomonas</i>] — F. A. De Carli, J. Guerreiro, Zilma Freire & E. Nunes	53
---	----

Volume 8, Número 3 — Julho-Setembro, 1977

Artigos originais

Influência das condições de cultivo na produção da enterotoxina termolábil de <i>Escherichia coli</i> [Influence of culture conditions in the production of <i>Escherichia coli</i> heat-labile enterotoxin] — Bernadette D. G. de Melo Franco & Luiz Rachid Trabulsi	55
Acumulações limosas na indústria de chapas de fibras de madeira. II. Caracterização e reprodução "in vitro" das acumulações limosas [Slime accumulations in fiberboard industries. II. Characterization and "in vitro" reproduction of slime accumulations] — Augusto Ferreira da Eira, Paulo de Campos Torres de Carvalho & Onaur Ruano	64
Flora fúngica anemófila da Grande São Paulo [Airborne fungi of the "Grande São Paulo" area (Brazil)] — Walderez Gamble, Adhemar Purchio & Júlio Croce	74
Uso da panela de pressão comum para esterilização [The use of pressure cooker for sterilization] — Edison Paulo Tavares de Oliveira, Hideyo Izuka, Hisako Gondo Higashi, José L. Brunini & José Luís de Lorenzo	80
Sensibilidade "in vitro" de leveduras do gênero <i>Candida</i> à violeta de genciana [Sensitivity "in vitro" of several <i>Candida</i> spp. to gentian violet] — Arlete Emily Cury, Paulo S. Minami & Dulcínéia Saes Parra	84

Caracterizacion bioquimica y significado clínico de una especie recientemente descrita dentro da familia enterobacteriaceas: <i>Citrobacter diversus</i> [Biochemical characterization and clinical signification of a recently described species in Enterobacteriaceae: <i>Citrobacter diversus</i>] — Gustavo Prieto, Jeannette Vargas, Hilda Bracho & Mary de Mestroni	89
Effect of pH, temperature and time of stirring on the solubility of trypsin used in cell cultures — Edda de Rizzo	94
Comparação entre hidrólise ácida e enzimática de amido para determinação de açúcares redutores totais [Comparison between acid and enzymatic hydrolysis of starch for determination of total reducing sugars] — Willibaldo Schmidell & Marcus Vinicius Fernandes	98

Volume 8, Número 4 — Outubro/Dezembro, 1977

Artigos originais

Programa institucional "Prêmios SBM em biologia de microrganismos"— João S. Furtado	102
Comparação antigênica entre <i>Tritrichomonas suis</i> e <i>T. foetus</i> — III imunoelétroforese (IEF) [Antigenic comparison between <i>Tritrichomonas suis</i> and <i>T. foetus</i> — III Immunoelectrophoresis (IEF)] — Geraldo A. De Carli & Jorge Guerrero	107
Natureza genética da fermentação de lactose em amostras de <i>Salmonella typhimurium</i> [Genetics of lactose fermentation in strains of <i>Salmonella typhimurium</i>] — Maria Heloiza Trebilcock Affonso; Maria Regina Fernandes de Toledo & Luiz Rachid Trabulsi	110
Factores "R" que median resistencia para ampicilina-carbenicilina en <i>Citrobacter diversus</i> [R factors mediating for ampicillin and carbenicillin resistance in <i>Citrobacter diversus</i>] — Gustavo Prieto, Jeannette Vargas, Ada Martinez & Hilda Bracho	117
Estudos comparativos entre o teste da alça ligada de intestino de coelho e do camundongo recém-nascido na detecção da enterotoxina termoestável (ST) produzida por <i>Escherichia coli</i> [Comparative studies between the rabbit ileal loop assay and the infant mouse test to detect heat-stable enterotoxin (ST) produced by <i>Escherichia coli</i>] — Antônio de Pádua Franceschi, A. F. Pestana de Castro, Marlene B. Serafim & Luiz Pustiglione Netto	123
Titulação de anticorpos diftérico e tetânico pelo método de absorção de sangue integral em papel de filtro [Diphtheric and tetanic antibody titration by the method of blood absorption in filter paper.] — Edison Paulo Tavares de Oliveira, Hideyo Izuka, Hisako Gondo Higashi & Joana Akiko Furuta.	129
Production of subtilopeptidase by a strain of <i>Bacillus subtilis</i> — R. M. Attia, Rawia F. Gamal & S. A. Z. Mahmoud	132
Ação da griseofulvina sobre a composição da parede celular em <i>Pycnoporus sanguineus</i> [Effect of griseofulvin on cell wall composition of <i>Pycnoporus sanguineus</i> .] — Mioco F. Gomes & Sônia M. C. Dietrich	136

Notas breves

The Influence of the host in the curing of a F'lac factor by acridine orange. Maria Regina Fernandes de Toledo, Rosa Maria Silva; Regina Gomes de Almeida & Luiz Rachid Trabulsi	141
Amostras de <i>Escherichia coli</i> , de origem animal, produtoras de enterotoxina termoestável (ST) isoladas de casos de diarréia em São Paulo, SP, Brasil [Heat-stable enterotoxin-producing stains of <i>E. coli</i> of animal origin isolated from cases of diarrhea in São Paulo State, Brazil] — Margareti Simões, Marlene B. Serafim, Angela C. Rodrigues, Waldyr Giorgi, Luiz Pustiglione Netto e A. F. Pestana de Castro	143
Frequency of <i>E. coli</i> 0136 and 0152 in faeces of children and adults living in the Recife area, Pernambuco, Brasil — Diva Montenegro Melo, Maria Regina Fernandes de Toledo & Luiz Rachid Trabulsi	145

