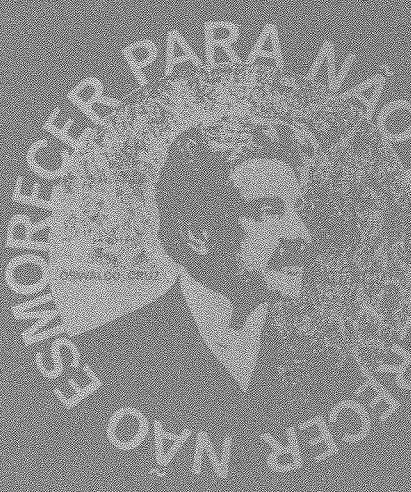
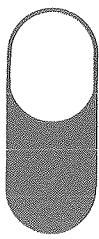


**Volume 9 Número 1 Jan.-Mar. 1978**

**Revista de Microbiologia**

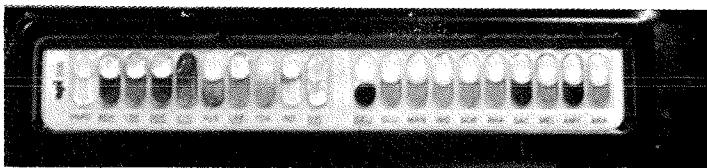
Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia  
São Paulo — Brasil





# api system

**abriu o caminho da estandardização  
na identificação bacteriológica.**



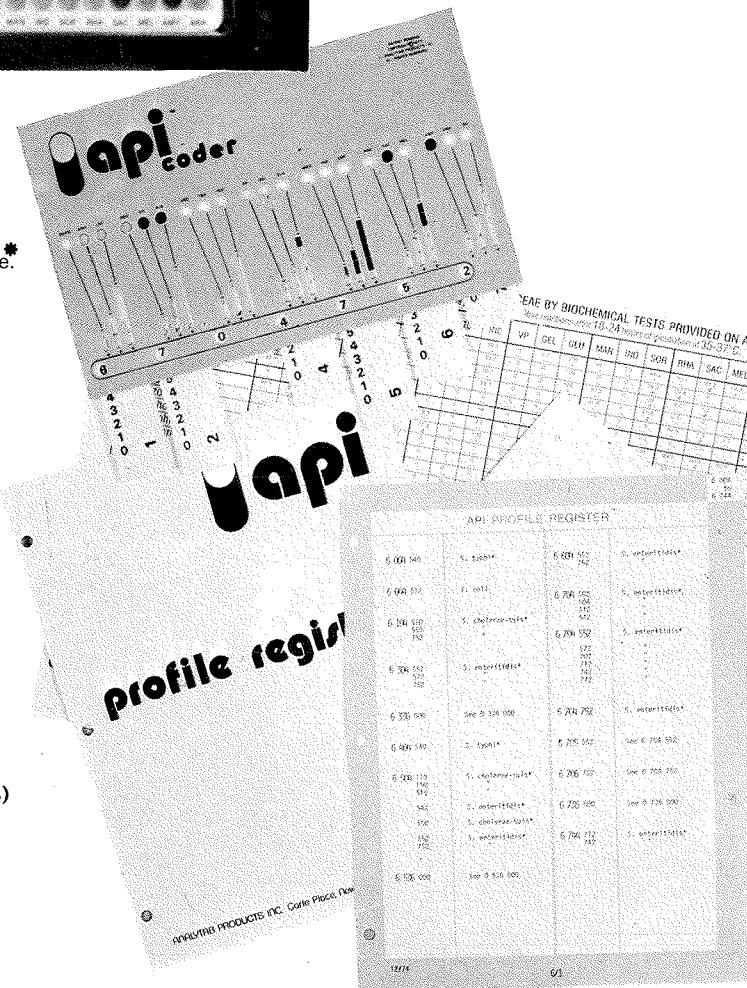
API 20 E e o SISTEMA DE LEITURA CODIFICADA põem à disposição dos laboratórios mais de 25.000 cepas registradas de ENTEROBACTERIACEAE\* e outros GRAM(-)não-Enterobacteriaceae.\* Esse é o resultado de vários anos de colaboração entre utilizadores, centros de referência e os serviços de pesquisa API na 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

**Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia**  
**São Paulo — Brasil**

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

**Diretor Executivo** João Salvador Furtado  
Instituto de Botânica  
Caixa Postal 4005  
01000 São Paulo SP

**Diretores Associados** Flávio Alterthum  
Instituto de Química — USP  
Caixa Postal 20780  
01000 São Paulo SP  
Sérgio Olavo P. da Costa  
Instituto de Química — USP  
Caixa Postal 20780  
01000 São Paulo SP

**Aquisição por não-membros** Assinatura anual para quatro números: Cr\$ 300,00 para o Brasil; US\$ 20.00 (via marítima) ou US\$ 25.00 (via aérea) para o Exterior. Números avulsos: Cr\$ 75,00 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 Diretor Executivo da Revista de Microbiologia.

**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 Director's office.

### Sociedade Brasileira de Microbiologia

**Diretoria** Presidente  
Gobert A. Costa  
Instituto de Pesquisa "Gonzaga da Gama Filho"  
R. Manoel Vitorino, 625 — Piedade  
20000 Rio de Janeiro RJ

Secretário Geral  
César Martins de Oliveira  
Instituto de Microbiologia UFRJ  
Ilha do Fundão  
20000 Rio de Janeiro RJ

Vice-Presidente  
Cláudio A. Jürgensen  
Instituto Biomédico  
R. Prof. Hernani Mello, 101  
24000 Niterói RJ

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

**Objetivos** A Sociedade Brasileira de Microbiologia, fundada em 28 de setembro de 1956, é sociedade civil, sem fins lucrativos, dedicada a agremiar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio e fazer aproximação com entidades que visem objetivos semelhantes. Organiza, anualmente, na última semana do mês de julho, o Congresso Brasileiro de Microbiologia e edita a Revista de Microbiologia, com distribuição trimestral. Para informações sobre a SBM, escrever para qualquer membro da Diretoria.

## 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 diretor.

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

A Revista segue, essencialmente, o "Style Manual for Biological Journals" (2<sup>a</sup> 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 milímicro ( $m\mu$ ) e micromico ( $\mu\mu$ ). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro ( $\mu m$ ;  $10^{-6}m$ ), ao invés de micro ( $\mu$ ); nanômetro ( $nm$ ;  $10^{-9}m$ ), ao invés de milímicro ( $m\mu$ ); e Angstroms ( $A$ ;  $10^{-10}m$ ). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ( $\mu g/ml$ ) ou microlitros por litro ( $\mu l$  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 "Berger's Manual of Determinative Bacteriology" (7<sup>a</sup> ed., 1957) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Berger 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 e minúsculas, 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 retículas devem ser feitas em papel brilhante, com contrastes adequado para a 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 50 separatas por artigo. Para encomendas maiores, o(s) autor(es) deve(m) entrar em entendimento com o Diretor Executivo, correndo as despesas por conta dos interessados.

# Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 9 Janeiro-Março 1978 Número 1

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 9 (1)

## CONTEÚDO

## CONTENTS

---

I. R. Baracho & Wilma Rose Coelho	1	Influência da idade e origem da colônia, na proporção de conídios binucleados em <i>Aspergillus niger</i>	Influence of age and origin of the colony in the proportion of binucleate conidia in <i>Aspergillus niger</i>
Paulo Pinto Gontijo Filho & George P. Kubica	4	Avaliação de testes simplificados para atividades ureásica e pirazinamidásica, na identificação de micobactérias	Evaluation of simple pyrazinamidase and urease tests for identification of mycobacteria
Paulo Fausto Cauduro	7	Identificação de <i>Flavobacterium meningosepticum</i> em casos de meningite	Identification of <i>Flavobacterium meningosepticum</i> in meningitis
Loreny Gimenes Giuglano Maria A. M. Meneguetti & Luiz Rachid Trabulsi	11	Produção de enterotoxina LT por amostras de <i>Escherichia coli</i>	LT enterotoxin production by <i>Escherichia coli</i>
D. P. Falcão W. H. Ewing & L. E. Britt	18	Relações antigênicas entre <i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> com outras enterobactérias	The antigenic relationship among <i>Yersinia enterocolitica</i> and <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> with other enterobacteria
Maria H. Lemos dos Reis Maria Judite Caram Ramos Luiz Rachid Trabulsi	24	Resistência de enterobactérias ao mercúrio: freqüência e natureza genética	Resistance to mercury in enteric organisms: frequency and genetic nature
Darci S. A. Watanabe	31	Influência da resistência cromossômica e extracromossômica a drogas no crescimento de <i>Escherichia coli</i>	Influence of chromosomal and extrachromosomal drug resistance in <i>Escherichia coli</i> growth.
Thuoshi Ioneda & Célio Lopes Silva	39	Isolamento e identificação de menaquinona de <i>Corynebacterium ovis</i> ( <i>C. pseudotuberculosis</i> )	Isolation and identification of menaquinone from <i>Corynebacterium ovis</i> ( <i>C. pseudotuberculosis</i> )
Darci S. A. Watanabe	44	Influência da multirresistência a drogas sobre o crescimento de <i>Escherichia coli</i>	Influence of multiple-drug resistance on the growth of <i>Escherichia coli</i>
Sérgio R. A. Leite Amabile K. Matida & Thuoshi Ioneda	48	Identificação de um éster de ácido ftálico encontrado entre os lipídeos de <i>Corynebacterium diphtheriae PW8</i>	Identification of an ester of phthalic acid from the lipids of <i>Corynebacterium diphtheriae PW8</i>
Marly Paiva Nunes Ítalo Suassuna & Arlindo F. Ascensão	52	Modificação da técnica para preparo de bacteriófago destinado ao diagnóstico bacteriológico de <i>Yersinia pestis</i>	A modified procedure for the preparation of bacteriophage suspensions for diagnosis of <i>Yersinia pestis</i>

---



## Influência da idade e origem da colônia, na proporção de conídios binucleados em *Aspergillus niger*\*

I.R. Baracho  
& Wilma Rose Coelho

### Resumo

Delineamento experimental envolvendo linhagens de *Aspergillus niger* mostrou que a idade da colônia não afeta as proporções de conídios binucleados. Contudo, em culturas monoconidiospóricas a proporção é afetada, fenômeno interpretado como uma consequência da condição heterocariótica das linhagens.

### Summary

*Influence of age and origin of the colony in the proportion of binucleate conidia in Aspergillus niger*

Experimental design involving strains of *Aspergillus niger* showed that age of the colony does not affect proportion of binucleate conidia. However, in monoconidiospore cultures the proportion is affected, a phenomenon interpreted as a consequence of the heterokaryotic condition of the strains.

### Introdução

Yuill (8) revelou que os conídios de *Aspergillus niger* van Tieghem eram uninucleados. Posteriormente, Chang & col. (1) demonstraram que as proporções de conídios binucleados eram de 60-65%, em três linhagens haplóides, e de 87-92%, em duas diplóides. O estudo de 34 linhagens da mesma espécie (I.R. Baracho e W. R. Coelho, dados não publicados) revelou grande variação na proporção de conídios binucleados, em que nenhuma apresentou 100% de uninucleados.

A produção de conídios binucleados parece ser importante característica em *A. niger*. Como os conídios podem ser heterocárióticos (1), o fenômeno pode ter consequências em estudos genéticos do fungo ou em seu melhoramento, para produção industrial. A instabilidade na produção industrial poderia ser, em alguns casos, consequência de heterocariose.

Na produção de conídios binucleados, por *A. niger*, há fatores genéticos e ambientais a serem investigados. Neste trabalho, procurou-se verificar influência da idade e origem da colônia, na produção de conídios binucleados.

### Material e Métodos

Com o emprego do meio de cultura Czapek-Dox com 1% de glicose (p/v) e 2% de agar, foram estudadas quatro linhagens de *Aspergillus niger*, do laboratório de Genética de Microrganismos da UNICAMP. As culturas foram mantidas a 5°C, em meio inclinado, e purificadas a cada seis meses.

As linhagens utilizadas foram 10v10, 12v27, 14v12 e 34v06, que provieram de indústrias onde teriam sido utilizadas para produção de ácido cítrico. Sua classificação, como *Aspergillus niger*, foi baseada em Raper & Fennell (6).

\* Trabalho realizado com auxílio da FAPESP e do CNPq; Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, 13100 Campinas SP Brasil.

*Preparação de lâminas* — A coloração dos núcleos dos conídios foi feita por técnica modificada de Robinow & Caten (7).

O fungo é inoculado no centro de placa de Petri, com 20ml de meio de cultura e colocado em estufa, a 28°C. Depois que a colônia cresce, um pedaço, juntamente com meio de cultura, é retirado e comprimido levemente sobre a lamínula, de tal modo que nela ficassem conídios desagregados. Sobre a lamínula coloca-se uma gota de solução de albumina a 5%, espalhada juntamente com os conídios. Depois de seca, a lamínula é colocada em solução fixadora de álcool, ácido acético e ácido láctico (6:1:1), durante 10 minutos. Depois da fixação, passa-se por série de álcool 95%, 70% e 50% e, finalmente, água destilada. Em seguida, faz-se hidrólise a frio durante cinco minutos e a 60°C durante seis minutos, com HCl 1N. Após a hidrólise, a lamínula é lavada cinco vezes em tampão fosfato pH 6,8, sendo posteriormente corada com Giemsa, de 10 a 15 minutos.

Depois de corada, a lamínula é colocada sobre uma lâmina, com tampão fosfato pH 6,8, e examinada ao microscópio, onde cerca de 300 conídios são contados.

## Resultados e Discussão

A análise da influência da idade da colônia, na proporção de conídios binucleados, foi feita com a linhagem 10v10, purificada a partir de culturas monoconidiospóricas. Em seguida, foram reisoladas quatro outras colônias, também monospóricas. Cada uma das quatro colônias reisoladas foi inoculada no centro de placa de Petri, com 20ml de meio de cultura e incubada a 28°C. A partir do terceiro dia de incubação, cada cultura foi examinada durante cinco dias consecutivos. Para isso, era retirado material da borda da colônia, com 3, 4, 5, 6 e 7 dias de cultivo. O material era retirado, as lâminas preparadas, pela técnica já descrita, e feita a contagem dos conídios.

Para análise da influência da origem da colônia, foram utilizadas as linhagens 10v10, 12v27, 14v12 e 34v06. Quatro colônias de cada linhagem foram isoladas, a partir de culturas monospóricas. Cada colônia era inoculada no centro de placa de Petri, com 20ml de meio de cultura e incubada a 28°C. Quando atingiam três centímetros de diâmetro, eram analisadas da seguinte maneira: cada colônia era dividida em quatro partes, denominadas A, B, C e D e, para cada

uma, estimada a proporção de conídios binucleados. Para isso, cada uma das partes era subdividida em quatro campos, sorteando-se o campo a ser analisado. Com material do campo sorteado, eram preparadas as lâminas e feita a contagem dos tipos de conídios, da maneira já descrita.

**Tabela 1** — Proporção de conídios binucleados em quatro colônias monospóricas da linhagem 10 v 10, em cinco dias consecutivos

Idade (dias)	Colônias			
	1	2	3	4
3	0,4621	0,4338	0,4956	0,5748
4	0,4943	0,5572	0,4945	0,5000
5	0,4824	0,5279	0,4636	0,4736
6	0,4835	0,4610	0,5793	0,5584
7	0,4912	0,4572	0,5268	0,5974

As proporções de conídios binucleados, para quatro colônias da linhagem 10v10, nas diversas idades, em que foram estudadas, estão incluídas na Tabela 1. Os dados foram normalizados, pela transformação ângulo =  $\text{arc sen } \sqrt{p}$  (3), e submetidos à análise de variância, cujos resultados são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** — Análise da variância para os dados da Tabela 1

Causa da variação	G.L.	QM	F
Colônias	3	2,51	0,38 n.s.
Idade	4	10,21	1,54 n.s.
Resíduo	12	6,62	
Total	19		

n.s. — não significativo; G.L. — graus de liberdade; Q.M. — Quadrado médio.

A análise revela que a idade da colônia não causou qualquer efeito na proporção de conídios binucleados. No crescimento da colônia, as proporções de conídios binucleados foram mantidas.

As proporções de conídios binucleados, para as quatro linhagens de *A. niger*, nas diversas partes que foram analisadas, estão na Tabela 3. Os dados foram normalizados, pelo tipo de transformação já referido e submetidos à análise de variância. O resultado dessa análise é apresentado na Tabela 4.

A análise revela o efeito de linhagem e intera-

**Tabela 3** — Proporção de conídios binucleados em quatro colônias, de quatro linhagens de *Aspergillus niger*

Colônias	1				2				3				4				
	Partes	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
Linhagem:																	
10 v 10	0,514	0,498	0,535	0,368	0,261	0,213	0,184	0,158	0,500	0,479	0,469	0,486	0,458	0,466	0,362	0,463	
12 x 27	0,484	0,529	0,521	0,723	0,776	0,756	0,651	0,613	0,714	0,654	0,667	0,767	0,643	0,652	0,689	0,630	
14 v 12	0,754	0,775	0,791	0,700	0,715	0,676	0,705	0,785	0,793	0,736	0,769	0,750	0,644	0,575	0,591	0,524	
34 v 06	0,673	0,626	0,603	0,629	0,627	0,418	0,425	0,258	0,619	0,552	0,519	0,382	0,162	0,155	0,275	0,272	

**Tabela 4** — Análise de variância para os dados da Tabela 3

Causa da variação	GL	QM	F	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>
Linhagem (L)	3	1363,61	5,82*	3,07	11,24
Partes (P)	3	19,56	0,62 n.s.	9,93	15,65
Colônia (C)	3	271,52	1,30 n.s.	3,4	10
L x P	9	26,72	1,57 n.s.		
L x C	9	210,48	11,95**		
P x C	9	11,80	0,67 n.s.		
L x P x C	27	17,61			

n.s. não significativo; \* significativo a 5% de probabilidade;  
\*\*significativo a 1% de probabilidade; GL grau de liberdade; QM Quadrado médio; n<sub>1</sub> e n<sub>2</sub> Grau de liberdade (4)

ção significativa linhagem x colônia. Isto indica que as linhagens se comportam de maneira diferente, em relação a colônias. Como essas colônias se originaram de um conídio, é uma indicação de que os conídios devem ter condição genética diferente.

Entretanto, o plano experimental usado não permite esclarecer se, no caso, estão envolvi-

dos fatores citoplasmáticos ou nucleares. Como são efeitos quantitativos, pressupor o envolvimento de fatores citoplasmáticos implica em hipótese mais complexa do que a de fatores nucleares. Sabendo-se que há conídios heterocarióticos em *A. niger* (1), é válido admitir que a interação linhagem x colônia seja indicativa da existência de conídios heterocarióticos, em algumas linhagens estudadas. Nesse caso, algumas colônias, de certas linhagens, poderiam apresentar maior ou menor proporção de conídios binucleados, por terem sido originalmente isoladas de conídios heterocarióticos. O aumento na proporção de conídios binucleados poderia decorrer do fenômeno descrito como "vigor heterocariótico" (2), o que já foi constatado, por exemplo, em relação ao tamanho do conídio (5).

A interação significativa linhagem x colônia pode, portanto, ser interpretada como um resultado das condições heterocarióticas de algumas linhagens.

## Referências Bibliográficas

- Chang L.T.C. & Tuveson, R.W. — The influence of heterokaryotic conidia on the selective recovery of somatic diploids in *Aspergillus niger*. Mycologia, 66:67-72, 1974.
- Dodge, B.O. — Heterokaryotic vigor in *Neurospora*, Bull. Torrey Bot. Club, 69:75-91, 1942.
- Fisher, R.A. & Yates, F. — Statistical table for biological, agriculture and medical research, Olives and Boyd, Ltd. England, 1943.
- Pimental Gomes, F. — Curso de Estatística Experimental — ESALQ. Piracicaba, SP., 1966.
- Prasard, I. — Genetic analysis of the coloured mutants of *Aspergillus niger*. Genetica, 41:388-398, 1970.
- Raper, K.B. & Fennell, D.I. — The Genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1965.
- Robinow, C.F. & Caten, C.E. — Mitosis in *Aspergillus nidulans*, J. Cell Sci., 5:403-431, 1969.
- Yuill, E. — The number of nuclei in conidia of Aspergilli. Trans. Brit. Mycol. Soc., 33:324-331, 1950.

## Avaliação de testes simplificados para atividades ureásica e pirazinamidásica, na identificação de micobactérias\*

Paulo Pinto Gontijo Filho\*\*  
 & George P. Kubica\*\*\*

### Resumo

Foi feita a avaliação das modificações introduzidas por Wayne nos testes utilizados para definir as atividades ureásica e pirazinamidásica de micobactérias. Aproximadamente 80% (42/53) das amostras testadas, pertencem às espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. avium-intracellulare*, e com relação as mesmas, houve apenas duas exceções (4,8%) no teste pirazinamidásico e uma (2,4%) no teste ureásico. Recomenda-se a utilização desses testes em laboratórios especializados em taxonomia de micobactérias.

### Summary

*Evaluation of simple pyrazinamidase and urease tests for identification of mycobacteria*  
 The simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria described by Wayne were examined. Approximately 80% (42/53) of the strains studies belong to *M. tuberculosis*, *M. bovis* or *M. avium-intracellulare*. Among these only two (4,8%) behaved differently in the pyrazinamidase test and one (2,4%) in the urease test. It is suggested that the technic can be applied to mycobacteria in a routine diagnostic laboratory.

### Introdução

A maioria das micobactérias, isoladas em laboratório clínico, pode ser identificada com elevado grau de segurança, pela realização de poucos testes bioquímicos (5, 7). No entanto, se a identificação não for possível, pela pequena bateria de testes, o microrganismo deve ser submetido a provas adicionais.

A determinação da atividade amidásica é útil, na classificação de micobactérias (1-4), mas é difícil de ser executada, em virtude da complexidade da técnica, provavelmente, responsável pelos resultados conflitantes, apresentados por diferentes laboratórios (6).

Em 1974, Wayne (6) descreveu testes simplificados para estudo das atividades ureásica e pirazinamidásica, possíveis de serem utilizadas em laboratórios de diagnóstico. Na presente in-

vestigação, esses testes foram aplicados em amostras de micobactérias, com predominância de *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. avium-intracellulare*.

### Material e Métodos

**Microrganismos** — Foram utilizados 53 amostras do "Trudeau Mycobacterial Culture Collection, Trudeau Institute, Saranac Lake, N.Y., USA", a saber: 20 de *M. tuberculosis*, três de *M. bovis*, oito de *M. bovis* (BCG), duas de *M. avium*, nove de *M. intracellulare*, duas de *M. kansasii*, duas de *M. scrofulaceum* e uma de cada das seguintes espécies: *M. marinum*, *M. gordonae*, *M. nonchromogenicum*, *M. fortuitum*, *M. borstelense*, *M. phlei* e *M. smegmatis*.

\* Trabalho realizado no Trudeau Institute, Saranac Lake, N.Y., USA.

\*\* Instituto de Microbiologia da UFRJ, Ilha do Fundão, 20000 Rio de Janeiro RJ. Bolsista do CNPq.

\*\*\* Bureau of Laboratories. Center for Disease Control. Atlanta, Ga, USA.

**Teste pirazinamidásico** — dissolver 6,5g de "Dubos Broth Base" (Difco) em 1.000ml de solução contendo 100mg de pirazinamida, 2g de piruvato de sódio e 15g de agar. A mistura resultante é aquecida, até fusão do ágar, e distribuída em volumes de 5ml, em tubos 16 × 125mm, com tampa de rosca. O meio é autoclavado a 121°C por 15 min., deixado solidificar em posição vertical e semeado a partir do crescimento de quatro semanas em Loewenstein-Jensen, utilizando-se uma alça de platina contendo massa de microrganismos visíveis à vista desarmada. As culturas são incubadas a 37°C, exceto *M. marinum*, que deve ser mantida a 32°C, e, após quatro e sete dias, adiciona-se 1ml de solução de sulfato duplo ferroso e de amônio a 1%, a cada tubo, e coloca-se as culturas em refrigerador, para prevenir o crescimento de contaminantes porventura existentes no reagente.

Após quatro horas no refrigerador (4°C), os tubos são observados quanto ao aparecimento de banda rósea, logo abaixo da superfície do ágar, cuja visualização indica a presença de ácido pirazinólico, produto da hidrólise de pirazinamida.

**Teste ureásico** — "Difco-Bacto Uréia Agar Base" sem agar é diluído a 1:10, em água destilada estéril, e distribuído em volumes de 3ml, em tubos 13 × 100mm, com tampa de rosca. O inóculo é feito como no teste anterior, suspendendo-se, na solução com o substrato, e incubando-se por três dias a 37°C. Nos testes positivos, a coloração muda de amarelo para vermelho. A amostra de *M. marinum* deve ser testada a 32°C.

Nos dois testes incuba-se, simultaneamente um tubo, não inoculado, como controle.

## Resultados e Discussão

Os resultados dos testes pirazinamidásico e ureásico são referidos na Tabela 1. A maioria das amostras testadas pertence às espécies *M. tuberculosis* (20/53) e *M. bovis* (11/53). Essas amostras apresentam atividade ureásica, mas divergem na capacidade de hidrolisar a pirazinamida, sendo as de *M. bovis* negativas e as de *M. tuberculosis* positivas (18/20).

O teste utilizando pirazinamida como substrato pode ser útil na distinção de espécies que apresentam comportamento similar tais como: *M. kansasii* (reação negativa) e *M. marinum*

**Tabela 1** — Freqüência de reações ureásica e pirazinamidásica positivas entre as diferentes espécies de micobactérias

MICRORGANISMO	Urease		Pirazinamidase		
	Nº de testado	Nº positivos	Nº testado	Nº de positivos (cumulativo) em 4 dias	Nº de positivos em 7 dias
<i>M. tuberculosis</i>					
amostras virulentas	10	10	10	8	10
amostras resistentes às drogas	10	10	10	7	8
<i>M. bovis</i>					
amostras virulentas	2	2	2	—	—
amostras resistentes às drogas	1	1	1	—	—
amostras de BCG	8	8	8	—	—
<i>M. avium</i>					
<i>M. intracellulare</i>	2	—	2	1	2
<i>M. kansasii</i>	9	1	9	7	9
<i>M. marinum</i>					
<i>M. scrofulaceum</i>	2	2	2	1	1
<i>M. gordonae</i>	1	—	1	—	—
<i>M. nonchromogenicum</i>	1	—	1	1	1
<i>M. smegmatis</i>					
<i>M. phlei</i>	1	1	1	1	1
<i>M. borstelense</i>	1	1	1	—	—
<i>M. fortuitum</i>	1	1	1	1	1
Total	53	53			

(reação positiva em 4 dias), *M. avium-intracellularare* (hidrolisa pirazinamida) e *M. bovis* (não hidrolisa pirazinamida). Adicionalmente, amostras de *M. bovis* apresentam, esporadicamente, teste niacínico positivo ou duvidoso e a definição de atividade pirazinamidásica poderia distinguir esses microrganismos de *M. tuberculosis* (6).

Foi utilizada apenas uma amostra de *M. kansasii* e uma de *M. marinum*, o que dificultou a discussão do valor do teste para distinção dessas espécies. No tocante à separação de *M. bovis* (reação negativa) de *M. avium-intracellularare* e *M. tuberculosis* (reação positiva), os resultados encontrados confirmaram os dados da literatura. Foram observadas duas reações negativas com relação a *M. tuberculosis*, com as amostras TMC-311 (resistente à pirazinamida) e TMC-313 (resistente ao TBI), não hidrolisando a pirazinamida.

O teste ureásico permite distinguir *M. scrofulaceum*, potencialmente patogênico para o homem, de *M. gordonae*, micobactéria de hábito saprofítico. A distinção entre esses microrganismos é usualmente baseada na capacidade de hidrolisar o Tween 80, mas algumas amostras de *M. gordonae* podem dar uma resposta

tardia, dificultando a separação. Dessa forma, o fato de *M. scrofulaceum* hidrolisar uréia, ao contrário de *M. gordonae*, fornece o teste adicional para a identificação desses microrganismos. A determinação da atividade ureásica também poderia ser útil, na separação entre *M. avium-intracellulare* (reação negativa) e *M. scrofulaceum*, *M. bovis* e *M. tuberculosis* (reação positiva).

As poucas amostras de *M. scrofulaceum* e *M. gordonae* utilizadas comportaram-se como

esperado, assim como as de *M. tuberculosis* e *M. bovis*, enquanto apenas uma (TCM-1456) das 12 amostras de *M. avium-intracellulare* divergiu, hidrolisando a uréia.

As modificações propostas por Wayne (6), para realização dos testes ureásico e pirazinamidásico, exigindo reagentes e meios mais simples, parecem ser úteis na identificação de algumas espécies de micobactérias, quando houver problemas com os testes clássicos, usualmente aplicado em laboratórios especializados.

### Referências Bibliográficas

- 1 . Boenicke, R. — Über das Vorkommen von Acylamidase in Mycobakterien. IV. Mitteilung. Zentralblatt für Bakt., Parasit., Infekt. und Hyg., 178:209-233, 1960.
- 2 . Bonicke, R. — Identification of mycobacteria by biochemical methods. Bull. Int. U. Tuberc., 32:13-68, 1962.
- 3 . Gernez-Rieux, C.; Tacquet, A.; Devulder, B. & Debruyne, J. — Les mycobacterioses humaines. Méthodes actuelles de diagnostic bacteriologique. Aspects cliniques, thérapeutiques et épidémiologiques. Rev. Tuberc. Pneumol., 34:1-70, 1970.
- 4 . Juhlin, I. — Contribution to the classification of mycobacteria and nocardias. Acta. Path. Microbiol. Scand., 70 (Suppl. 189):1-120, 1967.
- 5 . Kubica, G.P. — Differential identification of mycobacteria. Amer. Rev. Resp. Dis., 107:9-21, 1973.
- 6 . Wayne, L.G. — Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. Amer. Rev. Respir. Dis., 109:147-151, 1974.
- 7 . Wayne, L.G. & Douberck, J.R. — Diagnostic key to mycobacteria encountered in clinical laboratories. Appl. Microbiol., 16:925-931, 1968.

## Identificação de *Flavobacterium meningosepticum* em casos de meningite

Paulo Fausto Cauduro\*

### Resumo

Foram isoladas cinco amostras de *Flavobacterium meningosepticum*. Duas (nrs. 1 e 5) foram tipificadas sorologicamente, como pertencentes ao tipo D e três (nrs. 2, 3 e 4), como do tipo E, e todas como agentes etiológicos de meningites em prematuros e recém-nascidos. Um esquema de diagnóstico bacteriológico, assim como os antibiogramas respectivos, são apresentados.

### Summary

*Identification of Flavobacterium meningosepticum in meningitis*

Five non-epidemic cases of meningitis of newborn or premature children in Rio Grande do Sul, due to *Flavobacterium meningosepticum* are related. The bacteriological characteristics and susceptibility to antimicrobial agents of the locally isolated strains are presented. The serological studies showed two strains belonging to serotype D and the other three to serotype E.

### Introdução

*Flavobacterium meningosepticum* foi primeiro descrito em 1944 por Shulmann & Johnson (13) num caso de meningite em prematuro, devida a bacilo Gram-negativo proteolítico.

O microrganismo foi isolado em casos estudados por Brody, Moore & King (4), em 1958, e caracterizado por King (10), no ano seguinte.

A partir destes trabalhos, foi cultivado em diversas oportunidades, em distintas áreas geográficas, mas sempre relacionado com meningite em prematuros ou recém-nascidos.

Vandepitte, Beeckmans & Buttiaux (15) relataram quatro casos isolados no Congo; Cabrera & Davis (5) estudam 14 casos em Ceilão; George, Cochram & Whelleer (8) relatam 44 isolamentos do *Flavobacterium meningosepticum* sendo 14 em meningites diagnosticadas no Children's Hospital, Columbus, Ohio.

No Brasil, Solé-Vernin, Ulson & Zuccolotto (12) em São Paulo apresentam um caso e Mardruga & col. (11) no Rio de Janeiro, referem

seis casos de meningite purulenta em recém-nascidos e um caso em adulto.

Como se trata de uma espécie bacteriana rara, no primeiro caso que nos chegou às mãos, tivemos certa dificuldade em alcançar o diagnóstico o que nos valeu a experiência para os casos subsequentes, justificando a presente comunicação.

### Material e Métodos

Neste trabalho relatamos cinco casos de isolamento de *Flavobacterium meningosepticum* em meningites de recém-nascidos e prematuros admitidos no Hospital Presidente Vargas, P. Alegre.

Todos os casos foram oriundos de outras instituições hospitalares, sendo um deles do interior do estado e foram estudados no período de um ano: três amostras isoladas em setembro de 1975 e duas em agosto-setembro de 1976.

Na observação de características culturais e

\* Faculdade de Farmácia de UFRGS e Laboratório Weinmann; Porto Alegre, RS.

capacidade de crescimento, foram utilizados os meios de Agar-Sangue (Trypticase Soy Agar BBL com 5% de sangue humano) o "S.S.-Agar" e o meio de Mac-Conkey.

Testes bioquímicos de fermentação foram realizados em meio CTA (BBL), adicionado de 1% dos diversos substratos. O estudo da atividade bioquímica complementar foi feito com o meio de Costa & Vernin (6) para observações sobre urease e acidificação de lactose e/ou sacarose, o "Phenylalanine Agar" (BBL) o "Malonale Broth Ewing Modified" (BBL), o "Simmons citrate Agar" (BBL) e o "SIM Medium" (BBL), este último para verificar produção de H<sub>2</sub>S e indol, além de mobilidade. Esta foi ainda comprovada por observação microscópica direta, entre lâmina e lamínula. A produção de gás sulfídrico foi comprovada igualmente com tiras de papel embebidas em acetato de chumbo. O teste da oxidase realizou-se com o emprego de solução aquosa a 1% de dimetil-p-aminoanilina mono-hidroxiclorado (Merck), segundo descrito por Gruber (9).

O estudo da sensibilidade aos antibiótico seguiu o processo de Kirby & Bauer (2).

## Resultados e Discussão

Do líquor nº 1, enviado ao laboratório, foi feita inicialmente coloração pelo método de Gram, após centrifugação, revelando numerosos bastonetes finos, Gram-negativos, extra e intra-cellulares, com morfologia semelhante à de *Haemophilus*.

A cultura exuberante, verificada no agar-sangue (Trypticase Soy Agar BBL com 5% de sangue humano), invalidou a suspeita inicial. Repetimos o Gram do crescimento, verificando a concordância de morfologia com a da lâmina original: bastonetes finos Gram-negativos.

Na hipótese de estarmos em presença de germe nutritivamente exigente, efetuamos a série bioquímica em meio CTA com os seguintes carboidratos: lactose, sacarose, glicose, manita e maltose.

Os resultados de fermentação e de testes bioquímicos adicionais são apresentados na Tabela 1; todos com leitura em 48 horas e incubação a 37°C; em 24 horas se observa discreta produção de indol.

O teste de oxidase com solução aplicada na superfície da placa com crescimento resultou fortemente positivo, eliminando o germe em estudo da família *Enterobacteriaceae*.

**Tabela 1** — Características bioquímicas de *Flavobacterium meningosepticum* (amostra 1) em testes de rotina

	Meio de cultura	Resultado
CV	Uréia	Negativo
	Acidific.	Negativo
	Indol.	Positivo
SIM	H <sub>2</sub> S mobilidade	Negativo Negativo
Citrato Simmons		Negativo
Fenilalanina		Negativo
Malonato		Negativo
CTA c/	lactose	Negativo
	sacarose	Negativo
	glicose	Positivo
	manita	Negativo
	maltose	Positivo

Investigamos sua inclusão no grupo de bactérios Gram-negativos descritos por Tatum, Ewing & Weaver (14) como "Miscellaneous Gram negative bacteria" e por Bailey & Scott (1) como "Microorganisms encountered in cerebrospinal fluid"

Ambas as fontes citavam os trabalhos de King (10) e seus colaboradores (4), relativos a bactérias Gram-negativas não classificadas e causadoras de meningites em recém-nascidos.

Efetivamos os testes indicados por esses trabalhos, como seguem: crescimento em SS-agar e MacConkey-agar, resultando, em nossa amostra, negativos e concordando com as observações de Cabrera & Davis (5) e a advertência feita por Blazevic (3) "muitas, mas nem todas as amostras crescem em MacConkey".

Ainda baseados nos trabalhos de King e colaboradores (10,4), recorremos à prova de catalase e à produção de H<sub>2</sub>S com papel embebido em acetato de chumbo, resultando ambas as provas positivas.

Estávamos, dado os resultados, em presença do germe descrito por King como *Flavobacterium meningosepticum*.

A sensibilidade aos antibióticos forneceu os seguintes dados: sensível à rifocina, rifampicina, novobiocina e ácido nalidíxico; sensibilidade intermediária à estreptomicina e resistência aos demais antibióticos testados (vide amostra 1 na Tabela 2).

No relato de King, é observada sensibilidade à estreptomicina; naquela oportunidade, não existiam os antibióticos que encontramos como sensíveis, mas Davis & col (7) relatam sensibili-

**Tabela 2** — Antibiograma das amostras de *F. meningosepticum*

Antibióticos	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
	1 (40.747)	2 (42.481)	3 (42.500)	4 (48.531)	5 (48.874)
Eritromicina	R	I	I	S	S
Novobiocina	S	I	I	S	I
Oxacilina	R	R	R	I	R
Tetraciclinas	R	R	R	I	I
Rifamicina	S	I	I	S	I
Tianfenicol	R	R	I	R	R
Cloranfenicol	R	R	R	I	R
Ac. nalidíxico	S	I	I	I	S
Estreptomicina	I	I	R	I	I

S = sensível

I = intermediário

R = resistente

OBS.: Antibióticos com resultados uniformes para todas as amostras:

Resistência: Penicilina, Cefalosporinas, Kanamicina, Ampicilina, Pristinamicina, Nitrofurantoina, Carbenicilina e Fosfomicina.

Sensibilidade: Rifampicina

dade de *Flavobacterium meningosepticum* à novobiocina, rifampicina e eritromicina e sensibilidade intermediária à estreptomicina, concordando com os nossos resultados, exceção feita à eritromicina, para a qual aquela amostra se mostrou resistente.

Elaboramos, a partir desta identificação, o esquema de caracterização, que se resume nas seguintes provas e respectivos resultados:

Crescimento em MacConkey agar.....	Variável
Oxidase.....	Positivo
Catalase.....	Positivo
Produção de H <sub>2</sub> S (SIM)	Negativo
Produção de H <sub>2</sub> S (papel com acetato Pb).....	Positivo
Produção de indol (tardio) ..	Positivo
Ação sobre carboidratos	
Glicose.....	Positivo (tardio)
Maltose.....	Positivo (tardio ou (-))
Manita.....	Positivo (tardio)
Motilidade.....	Negativo

Quatro outros casos foram isolados em recém-nascidos ou prematuros; as cinco amostras foram remetidas ao Dr. Robert E. Weaver, Bacterial Reference Unit of National Communicable Diseases Center, Atlanta, Georgia, U.S.A. para tipificação sorológico.

As amostras 1 e 5 foram classificadas como tipo D e as amostras 2, 3 e 4 como do tipo E, diferindo das isoladas por Madruga & col (11), que estavam relacionados aos tipos A, B e F e da cultura identificada por Solé-Vernin & col. (12), que teve confirmação diagnóstica de King, porém não pertencia a nenhum dos tipos sorológicos conhecidos. Naquela oportunidade, havia somente três tipos sorológicos, que atingem a seis atualmente.

Quanto às amostras de Cabrera & col. (5), são todas pertencentes ao grupo C, assim como as isoladas por George, Cochram & Whelton (8).

Na Tabela 2, apresentamos os resultados dos antibiogramas das cinco amostras isoladas, concluindo-se pela escolha da rifampicina como principal agente terapêutico ativo "in vitro", seguida da novobiocina, rifamicina e ácido nalidíxico.

A necropsia dos casos 2 e 3 revelou os seguintes diagnósticos anátomo-patológicos:

Caso 2: Meningoencefalite aguda supurativa; atelectasia pulmonar focal congestiva; broncopneumonia; congestão hepática; congestão suprarrenais; hipoplasia tímica

Caso 3: Meningoencefalite aguda supurativa; edema cerebral; hidrocefalia interna; broncopneumonia; hepatomegalia; esplenomegalia; hipoplasia tímica.

Os laudos foram fornecidos pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da U.F.R.G.S.

### Agradecimentos

Ao Dr. Robert E. Weaver, pela confirmação do diagnóstico bacteriológico e tipificação sorológica (C.D.C., Atlanta, Georgia). Ao Dr. Italo Suassuna (Instituto de Microbiologia U.F.R.J.), pela prestimosa colaboração.

## Referências Bibliográficas

1. Bailey, W.R. & Scott, E.G. — Diagnostic Microbiology 4<sup>a</sup> ed. C.V. Mosby Co. St. Louis, USA, 1974.
2. Bauer, W.A.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C. & Turk, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standartized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., 45:493-496, 1966.
3. Blazevic, D.J. — Current taxomony and Identification of nonfermentative, Gram-negative bacilli. Human Pathol., 7(3):265, 1976.
4. Brody, J.A.; Moore, H. & King, E.O. — Meningitis causes by an unclassified Gram-negative bacterium in newborn infants. Am. J. Dis. Child., 96:1-5, 1958.
5. Cabrera, H.A. & Davis, G.H. — Epidemic meningitis of the newborn caused by Flavobacteria. Am. J. Dis. Child., 101:289-295, 1961.
6. Costa, G.A. & Vernin, C.S. — Sobre uma modificação do meio de Monteverde. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 53 (1):105-111, 1955.
7. Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Elsen, H.N.; Ginsberg, H.S.; Wood Jr., W.B. & McCarty, M. — Microbiology. 2<sup>a</sup> ed. Harper & Row Publishers, Inc. Maryland, U.S.A., 1973.
8. George, R.M.; Cochram, C.P. & Whelleer, W.E. — Epidemiologic meningitis of the newborn caused by Flavobacteria. Am. J. Dis. Child., 101:296-304, 1961.
9. Graber, C.D. — Rapid diagnostic methods in medical microbiology. Williams & Wilkins Co., Baltimore, U.S.A., 1970.
10. King, E.O. — Studies on a group of previously unclassified bacteria associated with meningitis in infants. Am. J. Clin. Pathol., 31:241-247, 1959.
11. Madruga, M.; Zanon, U.; Pereira, G.M.N. & Calvão, A.C. — Contribuição ao estudo das meningites. J. Brs. Med., set. 1970.
12. Solé-Vernin, C.; Ulson, C.M. & Zuccolotto, M. — Verificação de *Flavobacterium meningosepticum* King. São Paulo, Rev. Inst. Med. Trop., 2:54-58, 1960.
13. Shulman, B.H. & Johnson, M.S. — A case of meningitis in a premature infant due to a proteolytic Gram-negative bacillus. J. Lab. Clin. Med., 29:500-507, 1944.
14. Tatum, H.W.; Ewing, W.H. & Weaver, R. E. — Miscellaneous Gram-negative bacteria. 2<sup>a</sup> ed. Washington, D.C., Manual of Clinical Microbiology, p. 270-294, 1974.
15. Vandepitte, J.; Beeckmans, C. & Buttiaux, R. — Quatre cas de meningite à *Flavobacterium* chez des nouveau-nés. Ann. Soc. Belge Méd. Trop., 38:563-570, 1958.

## Produção de enterotoxina LT por amostras de *Escherichia coli*\*

Lorenny Gimenes Giugliano\*\*  
 Maria Aparecida M. Meneguetti\*\*\*  
 & Luiz Rachid Trabulsi\*\*\*

### Resumo

Investigou-se a produção de enterotoxina LT em 614 amostras de *E. coli*, parte delas pertencendo aos tipos antigenicos-padrão e parte tendo sido isoladas das fezes de crianças e adultos com diarréia e outras perturbações intestinais. As amostras produtoras de enterotoxina LT foram estudadas quanto à sua estrutura antigenica e capacidade de produzir enterotoxina ST. Simultaneamente, verificou-se se um antisoro preparado contra a enterotoxina LT da amostra H10407 era capaz de neutralizar a enterotoxina das amostras estudadas. A enterotoxina LT foi ensaiada em células Y1 e a ST em camundongos recém-nascidos. Os seguintes resultados foram obtidos: 1 — As 175 amostras de colibacilos ente-ropatogênicos clássicos, as 25 de colibacilos invasores e as 16 de Alkalescens-Dispar não produziram enterotoxina LT. 2 — Produziram enterotoxina LT, cinco das 151 amostras de *E. coli* isoladas das fezes de crianças com diarréia aguda, quatro das 55 isoladas das fezes de adultos com diarréia, uma das 66 isoladas de crianças e adultos com infecções digestivas diversas e duas das 126 amostras-padrão. 3 — Das 12 amostras produtoras de enterotoxina LT, somente oito puderam ser investigadas quanto à estrutura antigenica pois as outras quatro eram rugosas. Os seguintes tipos sorológicos foram encontrados: 025 (imóvel), 06:H16 (duas amostras), 0114:H-, 078:H10, 0139:H28, 0109:H19 e 0138:H-. 4 — Das 12 amostras produtoras de toxina LT, cinco produziram também enterotoxina ST. Das cinco, quatro eram provenientes de adultos e uma de criança. 5 — Um antisoro preparado contra a enterotoxina LT das amostra H10407 neutralizou, de maneira aproximadamente idêntica, a atividade da enterotoxina de sete amostras estudadas.

### Summary

#### *LT enterotoxin production by Escherichia coli*

The capacity of 614 *E. coli* strains to produce enterotoxin LT was investigated. These strains included most of the standard *E. coli* serotypes strains and faecal strains from children and adults with diarrhea and others intestinal disturbances. The strains which produced LT enterotoxin were investigated in regard to their O and H antigens and their capacity to produce enterotoxin ST. An antiserum prepared against enterotoxin LT produced by strain 10407 was used in neutralization tests of the enterotoxin produced by all strains. Enterotoxin LT was assayed in Y1 cells and enterotoxin ST in infant mice. The following results were obtained: 1 — Enterotoxin LT activity could not be found in 175 strains of the classical enteropathogenic *E. coli* serotypes, 25 of invasive *E. coli* and 16 of Alkalescens-Dispar. 2 — Enterotoxin LT was produced by five out of 151 strains of *E. coli* isolated from children with diarrhea, four out of 55 from adults with diarrhea one out of 66 strains isolated from children and adults with different intestinal disturbances and by two of the standard *E. coli* serotypes strains. 3 — Four of the 12 strains which produced enterotoxin LT were rough. The other eight strains belonged to the following serotypes: 025 (non motile), 06:H16 (two strains), 0114:H-, 078:H10, 0139:H28, 0109:H19 and 0138:H-. 4 — Five out of the 12 strains which produced LT enterotoxin also produced enterotoxin ST. Of these, four were isolated from adults and one from a child. 5 — The enterotoxin activity of seven strains studied was neutralized by the antiserum prepared against the enterotoxin produced by strain H10407. However, neutralization was less evident for the enterotoxin produced by the two standard *E. coli* serotypes strains.

\* Parte da tese de mestrado de Lorenny Gimenes Giugliano, bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, realizada com o auxílio do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e National Science Foundation, dos Estados Unidos.

\*\* INPA — Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.

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

## Introdução

Embora seja provável que os efeitos de culturas vivas de colibacilos em alças ligadas do intestino do coelho, observados por vários autores, entre 1956 e 1962 (5, 22, 32, 33, 34) possam ter sido mediados por enterotoxinas, a produção destas substâncias por amostras de *E. coli* começou a ser realmente demonstrada com os estudos realizados com filtrados ou sobrenadantes de culturas a partir da segunda metade da década de 60. Assim, em 1967, Smith & Halls (28) verificaram que alças ligadas de intestinos de porcos e bezerros podiam apresentar acúmulo de líquido e dilatação quando inoculadas tanto com o filtrado como com as culturas integrais de amostras de *E. coli* isoladas das fezes dos mesmos animais com diarréia. Além disso, a substância dilatadora ou enterotoxina, era encontrada em maior quantidade no meio de cultura do que no interior da célula e não perdia sua atividade quando aquecida a 100°C por 30 minutos. Por esta razão, foi considerada termoestável, passando a ser chamada de enterotoxina ST (27). Em 1968, Kohler (20) verificou que uma enterotoxina, provavelmente idêntica à descrita por Smith & Halls (28) era capaz de causar diarréia em leitões recém-nascidos quando administrada por via intragástrica. Em 1969, Gyles & Barnum (19), também trabalhando com amostras de *E. coli* isoladas de suínos com diarréia, verificaram que o lisado de várias culturas continha uma enterotoxina capaz de dilatar alças ligadas de intestinos destes animais, mas esta enterotoxina diferia da ST porque perdia sua atividade quando aquecida a 65°C, por 15 minutos. Por esta razão, foi considerada termo-lábil, passando a ser conhecida como enterotoxina LT (27). Em 1971, Gorbach & col. (14), trabalhando na Índia, verificaram que o sobrenadante de culturas de várias amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com diarréia aguda, determinava acúmulo de líquido e dilatação de alças ligadas do intestino do coelho. Os estudos realizados por Sack & col. (24), sobre algumas características físico-químicas e fisiológicas da substância dilatadora, indicaram ser ela semelhante ou idêntica à enterotoxina LT.

Os trabalhos mencionados e vários outros realizados na época (23) estabeleceram o conceito de que amostras de *E. coli* podiam ser enterotoxigênicas de maneira indiscutível. Por outro lado, a introdução de modelos experimentais, mais simples para demonstração das ente-

rotoxinas LT (10) e ST (6) e, em particular, a descoberta de que a enterotoxina LT podia ser demonstrada por meio de testes, em certos tipos de linhagens celulares permanentes (7, 16), permitiram o avanço relativamente rápido de nossos conhecimentos sobre estas substâncias e sobre vários aspectos dos colibacilos capazes de produzi-las (23).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar em que extensão as amostras de *E. coli*, provenientes de várias fontes e representando diferentes grupos de patogenicidade, produzem enterotoxina LT.

## Material e Métodos

**Amostras** — Foram estudadas 614 amostras de *E. coli*, distribuídas da seguinte maneira:

*E. coli enteropatogênica clássica* — 175 amostras, sendo 103 isoladas entre 1963 e 1968, 64 isoladas durante a realização deste trabalho e 8 pertencentes aos grupos antigênicos-padrão (Tabela 1).

**Tabela 1** — Amostras de *E. coli* enteropatogênica clássica nas quais investigou-se produção de enterotoxina LT

Grupos antigênicos	Padrão	Nº de amostras		
		Isoladas entre 1963-1968	Isoladas durante a realização deste trabalho	Total
026	1	5	3	9
055	—	5	4	9
086	1	5	2	8
0111	1	40	39	80
0119	1	36	4	41
0125	1	5	2	8
0126	1	2	2	5
0127	1	1	5	7
0128	1	4	3	8
Total	8	103	64	175

*E. coli invasora* — 25 amostras, sendo 21 isoladas entre 1963 e 1968 e quatro correspondentes a grupos antigênicos-padrão (Tabela 2).

*E. coli do grupo Alkalescens-Dispar* — 16 amostras pertencentes aos grupos 01 e 02, sendo 14 isoladas em 1972 de indivíduos com diarréia e dois pertencentes aos grupos antigênicos-padrão.

**Tabela 2** — Amostras de *E. coli* invasora nas quais investigou-se produção de enterotoxina LT

Grupos antigênicos	Nº de amostras		
	Padrão	Isoladas entre 1963-1968	Total
028a, 28c	1	4	5
032	—	3	3
0112a, 112c	1	—	1
0124	1	5	6
0136	—	4	4
0143	1	—	1
0152	—	5	5
Total	4	21	25

*E. coli* não pertencente aos grupos antigênicos anteriores — Foram estudadas 398 amostras distribuídas das seguintes maneiras: a) Amostras correspondentes a grupos antigênicos-padrão: 126 amostras, sendo uma de cada um dos seguintes grupos: 03 a 025, 027, 029 a 031, 033 a 047, 049 a 054, 056 a 079, 081 a 085, 087, 088, 090 a 0110, 0113 a 0118, 0120 a 0123, 0129 a 0135, 0137 a 0142 e 0144 a 0146. b) Amostras isoladas de pacientes com distúrbios digestivos: 272 amostras, das quais 151 eram provenientes de crianças e 55 adultos com diarréia e 66 de crianças e adultos com queixas digestivas diversas.

*Origem e manutenção das amostras* — As amostras correspondentes aos grupos antigênicos-padrão foram trazidas do CDC (Atlanta) em 1962; as 16 amostras de *E. coli* do grupo Alkalescens-Dispar foram isoladas na Paraíba e as demais foram isoladas em São Paulo. As amostras isoladas antes do início deste trabalho foram mantidas em temperatura ambiente em tubos de agar-nutriente, fechados com rolha de cortiça parafinada, protegidos da luz. As amostras isoladas no decorrer do trabalho foram mantidas em tubos de agar-inclinado que permaneciam em temperatura ambiente ou em geladeira, até o momento da pesquisa de enterotoxina.

*Identificação das amostras* — Com exceção das amostras correspondentes aos grupos antigênicos-padrão, todas as demais foram identificadas bioquimicamente através de provas de rotina. As amostras de *E. coli* enteropatogênica clássica foram identificadas pelos procedimentos recomendados por Edwards & Ewing (9) e as de *E. coli* invasora, conforme descrito por Trabulsi & col. (36). Os抗ígenos O e H das amostras produtoras de enterotoxina foram investigados pelo método recomendado

por Ewing & Col. (11), utilizando-se 80 soros O a 48 H.

*Pesquisa de enterotoxina LT* — Foi feita em células Y1 (7) pela técnica descrita anteriormente (12), usando-se controles positivos e negativos. O arredondamento celular foi expresso em cruzes, tendo como base para leitura um frasco contendo somente células Y1: + + + + : 100% de arredondamento celular; + + + : 75% de arredondamento celular; + + : 25% de arredondamento celular; e —: sem arredondamento celular.

*Neutralização da toxina LT* — Foi preparado soro anti-enterotoxina LT, inoculando-se coelhos albinos com o sobrenadante estéril da amostra H10407, crescida em meio de Evans (10). Foram administradas quatro doses intradérmicas a intervalos de seis a sete dias, sendo que às duas primeiras foi acrescentado adjuvante completo de Freund. O soro assim obtido foi inativado por aquecimento a 56°C durante uma hora. A técnica de neutralização utilizada foi a descrita por Donta & col. (7). Uma hora antes do teste, incubava-se a 37°C 0,2ml do sobrenadante estéril da amostra enterotoxigênica com 0,2ml do soro anti-enterotoxina nas seguintes diluições: 1/10, 1/50, 1/100 e 1/200. Após este tempo, a mistura era testada nas células Y1 conforme a técnica já descrita.

*Pesquisa da enterotoxina ST* — Foi realizada em camundongos recém-nascidos, pelo método de Dean & col. (6).

## Resultados

*Amostras produtoras de enterotoxina LT* — As 175 amostras de colibacilos enteropatogênicos clássicos, pertencentes a diferentes grupos sorológicos, as 25 de colibacilos invasores e as 16 de *Alkalescens-Dispar* foram incapazes de produzir enterotoxina LT, isto é, não alteraram em qualquer extensão significativa a forma normalmente alongada das células Y1 (Tabela 3). Ao contrário, cinco das 151 amostras de *E. coli* isoladas de crianças com diarréia, quatro das 55 isoladas de adultos, também com diarréia e uma das 66 isoladas de pacientes portadores de distúrbios digestivos diversos, foram capazes de produzir enterotoxina LT. A última amostra foi isolada de um paciente adulto com diarréia aguda. É interessante observar que das 126

**Tabela 3** — Produção de enterotoxina LT por amostras de *E. coli*

Amostras	Número	
	Total	Produtoras de enterotoxina LT
<i>E. coli</i> enteropatogênica clássica (026; 055; 086; 0111; 0119; 0125; 0126; 0127 e 0128)	175	0
<i>E. coli</i> invasora (028a, 28c; 032; 0112a, 112c; 0124; 0136; 0143 e 0152)	25	0
<i>E. coli</i> Alkalescens-Dispar (01 e 02)	16	0
<i>E. coli</i> , pertencente aos grupos antigenicos-padrão*	126	2
<i>E. coli</i> , não pertencente aos grupos enteropatogênicos clássicos ou invasores.		
— Crianças com diarréia	151	5
— Adultos com diarréia	55	4
— Crianças e adultos com diarréia e outras afecções	66	1
Total	614	12

\*Os grupos antigenicos-padrão testados foram: 03 a 025, 027, 029 a 031; 033 a 047, 049 a 054, 056 a 079, 081 a 085, 087, 088, 090 a 0110, 0113 a 0118, 0120 a 0123, 0129 a 0135, 0137 a 142 e 0144 a 0146

**Tabela 4** — Tipos sorológicos das amostras de *E. coli* produtoras de enterotoxina LT

Amostras	Paciente	Tipo sorológico
13/74	criança	0114:H-
2161/75	adulto	025 (imóvel)
72/75	adulto	06:H16
102/75	adulto	rugosa
112/75	adulto	rugosa
246/75	adulto	06:H16
05/75	criança	078:H10
22/75	criança	0139:H28
126/75	criança	rugosa
204/75	criança	rugosa
CDC/109	—	0109:H19
CDC/138	—	0138:H-

amostras da coleção, duas produziram enterotoxina LT. As alterações apresentadas pelas células Y1, nos testes considerados positivos, foram perfeitamente típicas e o efeito da enterotoxina alterou mais de 80% das células. Obviamente, todos os controles efetuados apresentaram resultados esperados.

**Tipos sorológicos das amostras** — Das 12 amostras produtoras de enterotoxina LT, quatro estavam rugosas por ocasião da tipagem sorológica, o que impossibilitou a determinação do antígeno O. As oito amostras restantes pertenciam aos tipos: 025 (imóvel), 06:H16 (duas amostras), 0114:H-, 078:H10, 0139:H28, 0109:H19 e 0138:H- (Tabela 4).

**Produção de enterotoxina ST pelas amostras produtoras de enterotoxina LT** — Das 12 amostras produtoras de enterotoxina LT, cinco foram capazes de produzir enterotoxina ST. É interessante notar que, destas, quatro foram isoladas de adultos (Tabela 5).

**Tabela 5** — Produção de enterotoxina ST pelas amostras de *E. coli* produtoras de enterotoxina LT

Amostras	Paciente	Tipo sorológico	Produção da enterotoxina ST
13/74	criança	0114:H-	
2161/75	adulto	025 (imóvel)	+
72/75	adulto	06:H16	+
102/75	adulto	rugosa	+
112/75	adulto	rugosa	+
246/75	adulto	06:H16	—
05/75	criança	078:H10	—
22/75	criança	0139:H28	—
126/75	criança	rugosa	+
204/75	criança	rugosa	—
CDC/109	—	0109:H19	—
CDC/138	—	0138:H-	—

**Neutralização da enterotoxina LT** — O soro preparado contra a enterotoxina LT, produzida pela amostra H10407, neutralizou a atividade da enterotoxina das outras amostras, embora de maneira irregular (Tabela 6). As diferenças mais acentuadas dizem respeito às enterotoxinas produzidas pelas amostras CDC 109 e CDC 138.

## Discussão

A verificação de que nenhuma amostra de colibacilo enteropatogênico clássico, recém isolada ou não, foi capaz de produzir enterotoxina LT, exclui a possibilidade de que a produção desta substância seja o mecanismo de enteropatogenicidade destas bactérias. O estabelecimento deste fato, comprovado recentemente por outros investigadores (13), somado ao conhecimento de que estes colibacilos não são invasores (13, 35) e, em regra, não produzem enterotoxina ST (13), tem levantado dúvidas quanto a sua enteropatogenicidade (13). É possível, realmente, que alguns sorotipos não sejam enteropatogênicos. Entretanto, com relação a outros, como por exemplo os colibacilos do grupo 0111:B4, as evidências clínico-bacteriológicas e experimentais (4), acumuladas desde os trabalhos de Adam & Chen (1) e Adam (2) na década de 1920, não podem ser desprezadas. Antes de passarmos a considerá-los não enteropatogênicos, parece-nos mais sensato investigar a existência de outros mecanismos de patogenicidade.

Os resultados obtidos com as demais amostras utilizadas podem ser considerados como esperados ou pelo menos não surpreendentes. É interessante realçar, porém, que as amostras, CDC 109 e CDC 138, isoladas pelo menos há mais de 15 anos, foram ainda capazes de produzir enterotoxina LT. Esta verificação indica que o plasmídio *ent* pode ser bastante estável em certos hospedeiros.

Teoricamente, podemos aceitar que qualquer tipo sorológico de colibacilo é capaz de produzir as enterotoxinas LT e ST ou uma delas, bastando para isto que a linhagem esteja albergando o plasmídio *ent*, elemento genético transferível por conjugação (26, 29, 30). De fato, a tipagem sorológica vem demonstrando que as amostras enterotoxigênicas de *E. coli* podem pertencer a uma grande variedade de tipos sorológicos. Entretanto, a análise dos resultados relatados por outros autores (24) e por nós (Tabela 4) tendem a sugerir a possibilidade de que alguns tipos sorológicos sejam hospedeiros mais constantes do plasmídio *ent*. Por exemplo, vários autores tem verificado, como nós, que os colibacilos dos grupos 06 e 078, são produtores de enterotoxina, isto em áreas tão distantes uma das outras como Brasil, México, Estados Unidos e Índia (8, 23). É necessário continuar investigando a relação entre produção de enterotoxinas, seja LT ou ST, e tipos sorológicos de *E. coli*, mesmo porque, se for comprovado que determinados tipos são produtores mais constantes de enterotoxina, o diagnóstico preliminar da infecção por estes colibacilos poderá ser feito por métodos semelhantes aos atualmente utilizados para os colibacilos enteropatogênicos clássicos.

Até recentemente, os estudos realizados sugeriam que as amostras de *E. coli*, de origem humana, produziam sempre as duas enterotoxinas (23). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a produção isolada da enterotoxina LT, por amostras de origem humana, parece ser freqüente. Das 12 amostras produtoras de enterotoxina LT, somente cinco produziram também a ST. De modo interessante, duas amostras pertenciam a um só tipo sorológico de *E. coli* e eram provenientes de adultos. Recentemente, foram descritas três amostras de *E. coli* de origem humana, que produziam somente a enterotoxina ST (Serafim, M.B.; Castro, A.F.P.; Rangel, H.A. & Neto, L.P. — Isolation of heat-stable enterotoxin-producing strains of *Escherichia coli* isolated from cases of diarrhea in Campinas; a ser publicado). É prová-

**Tabela 6** — Neutralização da enterotoxina LT, de diferentes amostras de *E. coli*, com um soro preparado contra a enterotoxina LT da amostra H 10407

Amostras produtoras de enterotoxina LT	Diluição do soro				
	1/1	1/10	1/50	1/100	1/200
13/74	—	—	+	+	+++
5/75	—	—	—	++	+++
22/75	—	—	+	++	+++
126/75	—	—	+	++	+++
204/75	—	—	—	++	+++
CDC/109	—	+	++	+++	+++
CDC/138	+	+	++	++	++
H10407	—	—	—	++	+++

+ a ++++ = 25 a 100% de células Y1 arredondadas

— = 25% de células Y1 arredondadas

vel que a situação prevalente entre amostras humanas seja idêntica à existente entre amostras animais, nas quais é comum a produção de uma, ou das duas enterotoxinas (18). Aliás, não haveria razão para se pensar que os plasmídios *ent*, responsáveis pelas duas enterotoxinas, não pudessem segregar ou perder suas funções, separadamente.

Os resultados observados com as provas de soro-neutralização (Tabela 6) evidenciam que as enterotoxinas estudadas são, senão idênticas, pelo menos relacionadas antigenicamente, de acordo, aliás, com dados da literatura (17, 31). A eventual existência de toxinas não relacionadas antigenicamente teria evidentes implicações práticas no preparo de vacinas ou no desenvolvimento de métodos sorológicos, para pesquisa e identificação destas substâncias. Tal perspectiva teórica vem de encontro à existência de plasmídios que codificam enzimas de mesma função com diferentes composições antigênicas (3). A investigação do problema envolvendo um número maior de amostras faz parte de trabalho de pesquisa em andamento (no laboratório de L.R. Trabulsi).

Aparentemente, a produção de enterotoxina LT restringe-se, em regra, a certas amostras de *E. coli* não incluindo os colibacilos enteropatogênicos clássicos e invasores. Por outro lado, a frequência de amostras produtoras, observada por nós, foi relativamente baixa, quando comparada com a mencionada por outros autores (15, 17, 21, 25). Vários fatores podem ser mencionados para explicar as diferenças encontradas, sendo importante destacar que o fato de muitas amostras terem sido estocadas, por período de tempo relativamente longo, pode ter influenciado os resultados.

## Referências Bibliográficas

1. Adam, A. & Chen, H.T. — Dyspepsiekoliserum. Experimentelle Grundlagen einer Serumprophylaxe und Serumtherapie der Dyspepsiekolinfektion. Jahrbuch für Kinderheilkunde. Bd., 119:81-89, 1928.
2. Adam, D. — Untersuchungen zur Pathologie der Durchfallerkrankungen des Säuglings. Acta Pediatr. 11:145-151., 1930.
3. Benveniste, R. & Davies, J. — Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial. Ann. Rev. Biochem., 42:471-506, 1973.
4. Braun, O.H. — Säuglings-Enteritis. III — Die Epidemiologie der Säugling-Enteritis., Georg Trügme Verlag-Stuttgart, p. 81-163, 1956.
5. De, S.N.; Brattacharya, K. & Sarkar, J.K. — A study of the pathogenicity of strains of the *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. J. Path. Bact., 71:201-209, 1956.
6. Dean, A.G.; Ching, Y.; Williams, R.G. & Harden, L.B. — Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis. 125:407-411, 1972.
7. 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, 183:334-335, 1974.
8. Dupont, H.L.; Formal, S.B.; Hornick, R.B.; Snyder, M.J.; Libonatti, J.P.; Sheahan, D.G.; Labrec, E.H. & Kalas, J. P. — Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. N. Engl. J. Med., 285:1-9, 1971.
9. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. — Identification of Enterobacteriaceae. Third Edition. Burgess Publishing Company, 1972.
10. Evans, D.J.; Evans, D.G. & Gorbach, S.L. — Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. Infect. Immunity, 8:725-730, 1973.
11. Ewing, W.H.; Tatum, H.W.; Davis, B.R. & Reavis, R.W. — Studies on the serology of the *Escherichia coli* group. CDC, U.S., Department of Health, Education and Welfare, Atlanta, 1956, (Reprint 1976)
12. Franco, B.D.G.M. & Trabulsi, L.R. — Influência das condições de cultivo na produção da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*. Rev. Microbiol., 8(3):55-63, 1977.
13. Goldschmidt, M.C. & Dupont, H.L. — Enteropathogenic *Escherichia coli*: Lack of correlation of serotype with pathogenicity. J. Infect. Dis., 133:153-156, 1976.
14. Gorbach, S.L.; Banwell, J.G.; Chatterjee, B.D.; Jacob, B. & Sack, R.B. — Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. I — Alterations in intestinal microflora. J. Clin. Invest., 50:881-889, 1971.
15. Gorbach, S.L.; Kean, B.H.; Evans, D.G.; Evans Jr., D.J. & Bessudo, D. — Travelers diarrhea and toxicogenic *Escherichia coli*. N. Engl. J. Med., 292:933-936, 1975.
16. Guerrant, R.L.; Brunton, L.L.; Schnaitman, T.C.; Rebhun, L.I. & Gilman, A.G. — Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive "in vitro" assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. Infect. Immunity, 10:320-327, 1974.
17. Guerrant, R.L.; Moore, R.A.; Kirschenfeld, B.A. & Sande, M.A. — Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. N. Engl. J. Med., 293:567-573, 1975.
18. Gyles, C.L. — Heat-labile and heat-stable forms of the enterotoxin from *E. coli* strains enteropathogenic for pigs. Ann. N. Y. Acad. Sci., 176:312-322, 1971.
19. Gyles, C.L. & Barnum, D.A. — A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. J. Infect. Dis., 120:419-426, 1969.
20. Kohler, E.M. — Enterotoxic activity of filtrates of *Escherichia coli* in young pigs. Vet. Res., 29:2263-2274, 1968.
21. Merson, M.H.; Morris, G.K.; Sack, D.A.; Wells, J.G.; Feeley, J.C.; Sack, R.B.; Creech, W.B.; Kapikian, A.Z. & Gangarosa, E.J. — Traveler's diarrhea in Mexico; a prospective study of physicians and family members attending a Congress. N. Engl. J. Med., 294:1299-1305, 1976.
22. McNaught, W. & Roberts, G.B.S. — Enteropathogenic effects of strains of *Bacterium coli* isolated from cases of gastroenteritis. J. Path. Bact., 76:155-158, 1958.
23. Sack, R.B. — Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Ann. Rev. Microbiol., p.333-353, 1975.
24. Sack, R.B.; Gorbach, S.L.; Banwell, J.G.; Jacobs, B.; Chatterjee, B.D. & Mitra, R.C. — Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. J. Infect. Dis., 123:378-385, 1971.
25. Sack, R.B.; Hirschhorn, N.; Brownlee, I.; Cash, R.A.; Woodward, W.E. & Sack, D.A. — Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated diarrheal disease in Apache children. N. Engl. J. Med., 292:1041-1045, 1975.
26. Skerman, F.J.; Formal, S.B. & Falkow, S. — Plasmid-associated enterotoxin production in a strain of *Escherichia coli* isolated from humans. Infect. Immunity 5:622-624, 1972.
27. Smith, H.W. & Gyles, C.L. — The relationship between two apparently different enterotoxin produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. J. med. Microbiol., 3:387-401, 1970.
28. Smith, H.W. & Halls, S. — Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. J. Path. Bact., 93:531-543, 1967.
29. Smith, H.W. & Linggood, M.A. — Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent Plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhea. J. med. Microbiol., 4:467-484, 1971.
30. Smith, H.W. & Linggood, M.A. — The transmissible nature of enterotoxin production in a human enteropathogenic strains of *Escherichia coli*. J. med. Microbiol., 4:301-305, 1971.
31. Smith, H. & Sack, R.B. — Immunologic cross-reaction of enterotoxins from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. J. Infect. Dis., 122:164-170, 1973.
32. Taylor, J.; Malby, M.P. & Payne, J.M. — Factors influencing the response of ligated rabbit-gut segments to injected *Escherichia coli*. J. Path. Bact., 76:491-499, 1958.

33. Trabulsi, L.R. — Contribuição para o estudo das diarréias infantis pela *Escherichia coli*, a prova de enteropatogenicidade em coelho, como recurso na caracterização de possíveis "coli-patogênicos". Tese de Doutoramento, São Paulo, 1960.
34. Trabulsi, L.R. — Revelação de colibacilos associados às diarréias infantis pelo método da infecção experimental da alça ligada do intestino de coelho. Rev. Inst. Med. trop., São Paulo, 6:197-207, 1964.
35. Trabulsi, L.R. — Experimental kerato-conjunctivitis of the guinea-pig by enterobacteria. Rev. Inst. Med. trop., São Paulo, 7:16-23, 1965.
36. Trabulsi, L.R.; Fernandes, M.R.F. & Zuliani, M.E. — Novas bactérias patogênicas para o intestino do homem. Rev. Inst. Med. trop., São Paulo, 9:31-39, 1967.

## **Relações antigênicas entre *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis* com outras enterobactérias\***

D.P. Falcão\*\*

W.H. Ewing\*\*\*

& L.E. Britt\*\*\*

### **Resumo**

O estudo das relações antigênicas, entre *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis* com outras bactérias, mostrou reações de aglutinação entre抗原os de *Y. pseudotuberculosis* com soros somáticos de *Salmonella* de alguns grupos sorológicos, mas não com soros de *Escherichia coli* e *Y. enterocolitica*. Antígenos, preparados de amostras de *Y. enterocolitica* apresentam relações antigênicas com soros somáticos de *Salmonella*. Apesar de uma amostra aglutinou com soro de *Y. pseudotuberculosis*. O método de Roschka é bastante eficiente para o preparo de抗原os, utilizados como vacinas imunizantes de *Y. enterocolitica* e de *Y. pseudotuberculosis*, no preparo de seus antisoros.

### **Summary**

*The antigenic relationship among Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis with other enterobacteria*

A study of the antigenic relationship between *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* and between these two and other enterobacteria showed an agglutination reaction between antigens of *Y. pseudotuberculosis* with the somatic sera of *Salmonella* of a few serological groups but not with the sera of *Escherichia coli* and *Y. enterocolitica*. Antigens prepared from strains of *Y. enterocolitica* showed antigenic relations with somatic sera of *Salmonella*. Only one strain of *Y. enterocolitica* agglutinated with a serum of *Y. pseudotuberculosis*. The method of Roschka was found very efficient, for the preparation of antigens, used as immunization vaccines of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in the preparation of the antisera.

### **Introdução**

A partir do descobrimento da ocorrência de抗原os somáticos e flagelares em *Yersinia pseudotuberculosis*, por Shütze, em 1928 (26), surgiram inúmeras contribuições sobre a constituição antigênica na espécie (9, 13, 25, 27, 28, 29, 37).

Em conseqüência da reinvestigação do problema, Thal & Knapp (30) propuseram o esquema antigênico, atualmente aceito, segundo o qual há seis抗原os somáticos, designados I a VI (sendo os grupos I, II, IV e V divididos em subgrupos A e B); um抗igeno rugoso R (co-

mum a todas as amostras); e cinco抗igenos flagelares.

O esquema proposto não incluiu o fator somático 13, descrito por Wetzler & col. (37), em *Y. pseudotuberculosis* e outras espécies de enterobacteríaceas. Isto provavelmente ocorreu em conseqüência da diferença de metodologia utilizada. Enquanto Wetzler & col. se valeram da técnica de hemaglutinação, o esquema atualmente aceito segue a análise antigênica clássica, baseada em aglutinação e absorção. O grupo VI, no esquema de Thal & Knapp (30), corresponde ao tipo X, originalmente descrito por Itagaki & col. (9) e Sasaki & col. (25).

\* Trabalho realizado no Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, EUA, com Bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (74-803).

\*\* Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara — Universidade Estadual Paulista, 14800 Araraquara SP.

\*\*\* Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, EUA.

A composição química dos antígenos de *Y. pseudotuberculosis* foi estudada por Davies (4) e Samuelsson & col. (24). Detalhes da técnica para preparo dos antígenos são fornecidos por Thal (28).

O primeiro esquema antigênico para *Yersinia enterocolitica* foi realizado por Winblad (38), propondo oito grupos somáticos. Posteriormente, foi acrescentado o grupo IX, que apresenta relações antigênicas com *Brucella* (1, 2, 3, 6, 8).

Após o isolamento de novas amostras de *Y. enterocolitica* que não aglutinavam com soros imunes dos nove grupos existentes, Wauters (33) e Wauters & col. (34, 35) ampliaram o esquema antigênico existente, definindo 34 fatores somáticos e 17 antígenos flagelares.

Knapp e Thal (14, 15) não aceitaram que muitas dessas novas amostras fossem classificadas como *Y. enterocolitica*, devido a suas características bioquímicas aberrantes. Propuseram um esquema antigênico simplificado, composto de seis grupos somáticos (sendo o grupo I dividido em subgrupos A e B).

Wauters (33) e Winblad (38, 39) descreveram técnicas para a obtenção dos soros imunes de *Y. enterocolitica*. Segundo Winblad (38, 39), antisoros de *Y. enterocolitica* preparados com células autoclavadas possuem aglutininas comuns a algumas outras enterobactérias; isto não é observado quando os soros são preparados com células não autoclavadas. Nesse caso, apesar de não aparecerem anticorpos comuns a algumas espécies da família *Enterobacteriaceae*, continuam ocorrendo reações cruzadas entre antígenos de *Y. enterocolitica* dos grupos somáticos I a IV, mas não entre os antígenos dos grupos V a VIII.

Maeland & Digranes (16) demonstraram, em *Y. enterocolitica* e em *Y. pseudotuberculosis*, a presença de um antígeno comum às demais enterobactérias, mas ausente em outras bactérias gram-negativas.

Corbel (3) demonstrou a existência de relação sorológica entre antígeno somático 030 de *Salmonella* e antisoro de *Y. enterocolitica*.

Vários autores têm demonstrado relações antigênicas entre *Y. pseudotuberculosis* e *Salmonella* dos grupos B, D<sub>2</sub>, H; *Escherichia coli* dos tipos sorológicos 077, 017, 055; e *Enterobacter cloacae* (11, 12, 13, 18, 26, 28).

Nesse trabalho, são estudadas as características antigênicas de *Y. enterocolitica* e de *Y. pseudotuberculosis*, objetivando detectar relações antigênicas com outras bactérias da fa-

mília Enterobacteriaceae. Também é realizada a avaliação do antígeno de Roschka, como vacina imunizante, no preparo de soros imunes dessas espécies bacterianas.

## Material e Métodos

*Preparo de soros imunes* — Para verificar as relações antigênicas entre as duas espécies, foram preparadas soros contra as amostras Ye 75, Ye 62, Ye 614, Ye 96, Ye 97, Ye 373, Ye 161, de acordo com Knapp & Thal (14) e soros contra as amostras P 281, P 7, P 105, P 32, P 308, P 463, conforme Thal & Knapp (30).

O antígeno usado na imunização dos animais foi preparado pelo método de Roschka (22), que consiste no seguinte: as bactérias são cultivadas em placas de "Blood Base Agar", durante 30 horas, a 22°C. Com auxílio de uma lupa, seleciona-se uma colônia lisa, a qual é transferida para "Trypticase Soy Broth" e incubada a 22°C, por 30 horas. Em seguida, separam-se placas de 20cm de diâmetro, contendo o seguinte meio de cultura, esterilizado por autoclavagem:

"Yest Extract" — Difco	— 3g
"Trypticase Soy Broth" — BBL	— 15g
"Tryptose Broth" — Difcto	— 13,5g
Agar-Agar — BBL	— 20g
Água destilada	— 1.000ml

Após incubação das placas, por 36 horas a 22°C, o crescimento é removido com solução fisiológica, até que resulte em suspensão densa, a qual é aquecida a 100°C, durante 2 horas, em forno de Arnold, para inativar os antígenos flagelares e, a seguir, centrifugada a 8.000 rpm, durante 20 minutos, a 4°C. O sedimento é ressuspenso em álcool a 95% e incubado durante 4 horas a 37°C, em banho-maria. A suspensão é novamente centrifugada, lavada duas vezes com acetona, colocada em estufa a 37°C, durante uma noite, para secar e, a seguir, triturada em gral. Nestas condições, pode ser conservada por vários anos. Para inoculação em animais, o pó é ressuspenso em salina estéril, em concentração semelhante à diluição três da Escala de MacFarland.

O animal inoculado foi o coelho, por via endovenosa, tendo-se observado intervalos de três a quatro dias entre cada inoculação. A concentração do antígeno foi sempre constante, tendo variado apenas o volume injetado (0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0ml da solução de antígeno). Quando a sangria de prova apresentava título

satisfatório de anticorpos, o animal era submetido à sangria total.

Os soros obtidos foram testados quanto a reações cruzadas e título de anticorpos.

As reações cruzadas foram eliminadas por absorção e os soros, com títulos não satisfatórios, foram concentrados. Para tal, eram colocados em tubo de diálise, cobertos com carboxi-metil-celulose, agitados de hora em hora, até que o volume original ficasse reduzido à metade.

Isto permitiu o preparo de soros com títulos de anticorpos bastante satisfatórios, conforme apresentado nas Tabelas 1 e 2, mostrando assim, que o antígeno de Roschka é eficiente para o preparo de soros contra *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*.

**Tabela 1** — Reações homólogas e heterólogas entre as amostras-padrão de *Yersinia enterocolitica*.

Antígeno da amostra	Títulos dos soros imunes						
	Grupo IA	Grupo IB	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
	Ye 75	Ye 62	Ye 614	Ye 96	Ye 97	Ye 373	Ye 161
Ye 75	1280	640	—	—	—	—	—
Ye 62	640	1280	—	—	—	—	—
Ye 614	—	—	1280	—	—	—	—
Ye 96	—	—	—	2560	—	—	—
Ye 97	—	—	—	—	2560	—	—
Ye 373	—	—	—	—	—	2560	—
Ye 161	—	—	—	—	—	—	2560

**Tabela 2** — Reações homólogas e heterólogas entre as amostras de *Yersinia pseudotuberculosis*.

Antígeno da amostra	Títulos dos soros imunes					
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
	P 281	P 7	P 105	P 32	P 308	P 463
P 281	1280	—	40	—	20	—
P 7	40	2560	20	—	20	40
P 105	—	—	1280	—	—	—
P 32	—	20	—	1280	—	—
P 308	—	—	—	—	2560	—
P 463	—	—	—	—	—	2560

**Estudo de relações antigênicas** — a) *Antisoros usados*: para o estudo de relações antigênicas com *Salmonella*, foram usados soros contra antígenos somáticos de *Salmonella*, contendo os fatores somáticos de 1 a 67.

Para o estudo de relações antigênicas com *E. coli*, foram usados soros contra antígenos somáticos de *E. coli*, sendo que 121 fatores somáticos foram testados. Esses soros contra

*Salmonella* e *E. coli* são preparados e usados no "Center for Disease Control". Os soros contra *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* foram por nós preparados. b) *Preparo dos抗ígenos*: os抗ígenos para os testes foram preparados a partir de 43 amostras de *Y. enterocolitica* e de 49 amostras de *Y. pseudotuberculosis*, todas de coleção e de diversas origens.

As amostras eram semeadas em "Blood Base Agar" (Difco) e incubadas a 22°C, durante 36 horas. O crescimento era removido e diluído com salina formolinizada a 0,5%, até atingir concentração semelhante à diluição três da Escala de MacFarland. Esperava-se uma hora, após a adição de salina formolinizada, antes de serem realizados os testes.

No início, os抗ígenos eram aquecidos a 100°C, durante 10 minutos, em Forno de Arnold. Como o aquecimento provocava auto-aglutinação, substituiu-se pela salina formolinizada.

Cultivando-se as bactérias à temperatura de incubação de 35-37°C, desenvolviam-se colônias rugosas. Por esse motivo, foi escolhida a temperatura de 22°C.

Para verificação de relações antigênicas entre *Salmonella*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, foi usada a técnica de aglutinação em lâmina.

Para o estudo das relações antigênicas com *E. coli* foi usada a técnica de aglutinação em tubo com diluições de 1:20 a 1:20.240.

## Resultados

A análise das relações antigênicas entre os organismos testados revelou os dados seguintes:

*Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* — os soros imunes, preparados com as amostras de *Y. enterocolitica*, não aglutinaram qualquer das amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Entretanto, o soro imune, preparado com amostra do grupo OII de *Y. pseudotuberculosis*, aglutinou a amostra de *Y. enterocolitica*, correspondente ao sorotipo 021 do esquema de Wauters & col. (35), sendo a aglutinação de intensidade média.

*Y. enterocolitica* e *Salmonella* — os soros contra os fatores 027, 043<sub>1,2</sub>, 047<sub>1,2</sub>, 055 e 066 de *Salmonella* aglutinaram determinados sorotipos de *Y. enterocolitica*, tendo a aglutinação variado de intensidade fraca a média (Tabela 3).

**Tabela 3** — Fatores sorológicos somáticos de *Salmonella* que aglutinaram com amostras de *Yersinia enterocolitica*

Fatores sorológicos de <i>Salmonella</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	
	Grupo somático	Número de amostras
027	021	1
043 <sub>1,2</sub>	08	2
043 <sub>1,2</sub>	018	1
047	014	1
055 <sub>1,2</sub>	017	1
066	016	1

*Y. enterocolitica* e *Escherichia coli* — não ocorreu aglutinação entre qualquer amostra de *Y. enterocolitica* e os 121 soros de *E. coli* utilizados.

*Y. pseudotuberculosis* e *Salmonella* — os soros contra os fatores 027, 09, 046, 018 e 050<sub>1,4</sub> de *Salmonella* aglutinaram determinados sorotipos de *Y. pseudotuberculosis* (Tabela 4). As reações com o soro 027 foram consideradas de intensidade média a forte e, as com os soros 09 e 046, de fracas a médias. Com o soro 018, foram consideradas de intensidade média e, com 050<sub>1,4</sub>, fracas.

**Tabela 4** — Fatores sorológicos somáticos de *Salmonella* que aglutinaram com amostras de *Yersinia pseudotuberculosis*

Fatores sorológicos de <i>Salmonella</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	
	Grupo somático	Número de amostras
027	OII	10
09, 046	OIV	8
018	OIV	3
050 <sub>1,4</sub>	OVI	2

*Y. pseudotuberculosis* e *Escherichia coli* — não ocorreu aglutinação entre qualquer amostra de *Y. pseudotuberculosis* com os 121 soros de *E. coli* utilizados.

## Discussão

De 43 amostras de *Y. enterocolitica* estudadas apenas sete aglutinaram com soros, contendo fatores somáticos de *Salmonella* (Tabela 3). As amostras com reações positivas, nestes testes, pertenciam a sorotipos menos representativos, com exceção de duas do grupo 08, que é o mais comum nos Estados Unidos (7, 36). As amostras responsáveis pela maioria

dos casos clínicos humanos, devidos a *Y. enterocolitica*, pertencem aos grupos somáticos 03, e 09 (5, 20, 21, 23, 31, 32).

Segundo Winblad (39), quando se imuniza coelhos com células de *Y. enterocolitica*, fervidas ou autoclavadas, o soro imune apresenta aglutininas contra outras bactérias gram negativas. Os soros imunes de *Y. enterocolitica*, preparados com antígenos de Roschka, apesar de aquecidos durante duas horas e meia a 100°C, não aglutinaram com antígenos preparados com amostras de *Y. pseudotuberculosis*.

No caso de *Y. pseudotuberculosis*, verifica-se que das 49 amostras estudadas 23 aglutinaram com os fatores somáticos de *Salmonella* (Tabela 4).

Os resultados obtidos coincidem com os de Schütze (26), Thal (28) e Knapp (13), que assinalam reações entre antígenos de *Y. pseudotuberculosis* do grupo OII com antisoros somáticos do subgrupo B de *Salmonella*. Dez das amostras estudadas, pertencentes ao grupo OII, apresentaram reações de aglutinação positiva com o fator 027, do subgrupo B de *Salmonella*.

As reações positivas, entre amostras de *Y. pseudotuberculosis* do grupo OIV com fatores 09 e 046, pertencentes ao subgrupo D de *Salmonella*, são coincidentes com os dados de Knapp (10), que assinala o mesmo tipo de relação antigênica. No entanto, não observamos reações de aglutinação entre amostras de *Y. pseudotuberculosis* com fatores de *Salmonella* do subgrupo H, como foi assinalado por Knapp (13).

As reações de aglutinação positiva, observadas entre amostras de *Y. pseudotuberculosis* do grupo OVI, com o fator somático 050<sub>1,4</sub> de *Salmonella*, não foram assinaladas por outros autores.

No que diz respeito a relações antigênicas entre amostras de *Y. pseudotuberculosis*, com fatores somáticos de *E. coli*, nossos resultados foram negativos, discordando, portanto, de Knapp (12), que assinala reações entre amostras de *Y. pseudotuberculosis*, do grupo OVI com soros imunes de *E. coli* dos grupos 017, 077, e dos de Mair & col. (18), que assinalam reações entre *Y. pseudotuberculosis* do grupo OVI, com o fator 055 de *E. coli*.

Embora as relações antigênicas tenham sido verificadas, há necessidade de reexame do problema, com o emprego de soros absorvidos e de testes de reciprocidade, a fim de que a confirmação do achado seja assegurada.

## Referências Bibliográficas

1. Ahvonnen, P.; Jansson, E. & Aho, K. — Marked Cross-Agglutination between *Brucellae* and a subtype of *Yersinia enterocolitica*. *Acta path. microbiol. scand.*, 75:291-295, 1969.
2. Ahvonnen, P. & Sievers, K. — *Yersinia enterocolitica* infection associated with *Brucella* agglutinins. Clinical features of 24 patients. *Acta med. scand.*, 185:121-125, 1969.
3. Corbel, M.J. — The serological relationship between *Brucella* spp., *Yersinia enterocolitica* serotype IX and *Salmonella* serotypes of Kauffmann — White group N. *J.Hyg.*, 75:151-171, 1975.
4. Davies, D.A.L. — The smooth and rough somatic antigens of *Pasteurella pseudotuberculosis*. *J.gen. Microbiol.*, 18:118-128, 1958.
5. Esseveld, H. & Goudzwaard, C. — On the epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections: pigs as the source of infections in man. In: International Symposium on *Yersinia, Pasteurella* and *Francisella*, Malmö, Apr. 10-12, 1972. Proceedings, Basel, S. Karger, 1973. p. 99-101.
6. Esseveld, H. & Goudzwaard, C. — Serological diagnosis in proven human infections with *Yersinia enterocolitica* type 9. In: International Symposium on *Yersinia, Pasteurella* and *Francisella*, Malmö, Apr. 10-12, 1972. Proceedings, Basel, S. Karger, 1973. p. 146-149.
7. Gutman, L.T.; Ottesen, E.A.; Quan, T.J.; Noce, P.S. & Katz, S.L. — An inter-familial outbreak of *Yersinia enterocolitica* enteritis. *New England. J. Med.*, 288:1372-1377, 1973.
8. Hurvell, B. — Differentiation of cross-reacting antibodies against *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* by electroimmuno assay. *Acta vet. scand.*, 16:318-320, 1975.
9. Itagaki, K.; Tsubokura, M.; Sasaki, T. & Nagai, T. — Distribution of *Pasteurella pseudotuberculosis* in Japan. In: International Symposium on pseudotuberculosis, 20th, Paris, July 24-26, 1967, Proceedings, Basel, S. Karger, 1968, p. 27-32.
10. Knapp, W. — Die diagnostische bedeutung der antigenen Beziehungen zwischen *Pasteurella pseudotuberculosis* und der *Salmonella* Gruppe. *Zbl. Balst. I. Abt. Orig.*, 164:57-59, 1955.
11. Knapp, W. — Neuere experimentelle untersuchungen mit *Pasteurella pseudotuberculosis*. (*Yersinia pseudotuberculosis*). *Arch. Hyg. Bakt.*, 149:715-731, 1965.
12. Knapp, W. — Serologische kreuzreaktionen zwischen *Pasteurella pseudotuberculosis* (Syn. *Yersinia pseudotuberculosis*), *Escherichia coli* und *Enterobacter cloacae*. In: International Symposium on Pseudotuberculosis, 20th, Paris, July 24-26, 1967. Proceedings, Basel, S. Karger, 1968, p. 179-186.
13. Knapp, W. — Über weitere antigene Beziehungen zwischen *Pasteurella pseudotuberculosis* und der *Salmonella*-gruppe. *Z. Hyg.*, 146:315-330, 1960.
14. Knapp, W. & Thal, E. — Die biochemische charakterisierung von *Yersinia enterocolitica* (Syn. *Pasteurella "X"*) als grundlage eines vereinfachten O-antigenschemas. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.*, A, 223:88-105, 1973.
15. Knapp, W. & Thal, E. — Differentiation of *Yersinia enterocolitica* by biochemical reactions. In: International Symposium on *Yersinia, Pasteurella* and *Francisella*, Malmö, Apr. 10-12, 1972. Proceedings, Basel, S. Karger, 1973. p. 10-16.
16. Maeland, J.A. & Digranes, A. — Common enterobacterial antigen in *Yersinia enterocolitica*. *Acta path. microbiol. scand. Sect. B.*, 83:382-386, 1975.
17. Mair, N.S. — *Pasteurella pseudotuberculosis* infection in Great Britain 1959-1966. In: International Symposium on *pseudotuberculosis*, 20th, Paris, July 24-26, 1967. Proceedings, Basel, S. Karger, 1968. p. 121-128.
18. Mair, N.S. & Fox, E. — An antigenic relationship between *Yersinia pseudotuberculosis* type 6 and *Escherichia coli* O group 55. In: International Symposium on *Yersinia, Pasteurella* and *Francisella*, Malmö, Apr. 10-12, 1972. Proceedings, Basel, S. Karger, 1973. p. 180-183.
19. Marx, A.; Sundulache, R.; Pop, A.; Cerbu, A. & Pop, A. — Serological cross-reactions between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* IX. *J. Hyg. Epidemiol. microbiol. immun.*, 18:429-431, 1974.
20. Rabson, A.R. & Koornhof, H.J. — *Yersinia enterocolitica* infections in South Africa. In: International Symposium on *Yersinia, Pasteurella* and *Francisella*, Malmö, Apr. 10-12, 1972. Proceedings, Basel, S. Karger, 1973. p. 102-105.
21. Rakovski, J.; Pauchová, V. & Aldová, E. — Human *Yersinia enterocolitica* infections in Czechoslovakia. In: International Symposium on *Yersinia, Pasteurella* and *Francisella*, Malmö, Apr. 10-12, 1972. Proceedings, Basel, S. Karger, 1973. p. 93-98.
22. Roschka, R. — *Klin. Med.*, 5:88, 1950. Apud: Edwards, P.R. & Ewing, W. H. Identification of *Enterobacteriaceae*. 3rd ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972. p. 202.
23. Rusu, V.; Lucinescu, S.; Stanescu, C.; Totescu, E. & Muscan, A. — Clinical and epidemiological aspects of the human *Yersinia enterocolitica* infection in Romania. In: International Symposium on *Yersinia, Pasteurella* and *Francisella*, Malmö, Apr. 10-12, 1972. Proceedings, Basel, S. Karger, 1973. p. 126-127.
24. Samuelsson, K.; Lindberg, B. & Brubaker, R.R. — Structure of O-Specific side chains of lipopolysaccharides from *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Bact.*, 117:1010-1016, 1974.
25. Sasaki, T.; Nagai, T.; Itagaki, K. & Tsubokura, M. — Immunological studies on the isolated strains of *Pasteurella pseudotuberculosis* in Japan. In: International Symposium on pseudotuberculosis, 20th, Paris, July 24-26, 1967. Proceedings, Basel, S. Karger, 1968. p. 167-178.
26. Schutze, H. — *Bacterium pseudotuberculosis rodentium*. Rezeptoren analyse von 18 stämmen. *Arch. Hyg.*, 100:181-194, 1928.
27. Schutze, H. — Studies in *B. pestis* antigens: II. The antigenic relationship of *B. pestis* and *B. pseudotuberculosis rodentium*. *Br. J. exp. Path.*, 13:289-293, 1932.
28. Thal, E. — Untersuchungen über *Pasteurella pseudotuberculosis*: unter besonderer Berücksichtigung ihres immunologischen Verhaltens. Lund. Aus dem Veterinärmedizinischen Staatsinstitut in Stockholm, 1954, 69p. Thesis.
29. Thal, E. — Weitere Untersuchungen über die thermostablen antigene der *Yersinia pseudotuberculosis*. (Syn. *Pasteurella pseudotuberculosis*). *Zentbl. Bakt. I. Orig.*, 200S:56-65, 1966.
30. Thal, E. & Knapp, W. — A revised antigenic scheme of *Yersinia pseudotuberculosis*. In: International Symposium on *Yersinia pseudotuberculosis*, Malmö, Apr. 10-12, 1972. Proceedings, Basel, S. Karger, 1973. p. 129-131.

- posium on Enterobacterial Vaccines, Berne, 1968. Proceedings, Basel, Karger, 1971, p. 219-222. (Symp. Series immunobiol. Standard., v. 15).
31. Toma, S. & Lafleur, L. — Survey on the incidence of *Yersinia enterocolitica* infection in Canada. *Appl. Microbiol.*, 28:469-473, 1974.
  32. Vandepitte, J.; Wauters, G. & Isebaert, A. — Epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections in Belgium. In: International Symposium on *Yersinia, Pasteurella* and *Francisella*, Malmo, Apr. 10-12, 1972. Proceedings, Basel, S. Karger, 1973. p. 111-119.
  33. Wauters, G. — Contribution à l'étude de *Yersinia enterocolitica*. Belgium, Universite Catholique de Louvain, 1970. 165p. Thesis.
  34. Wauters, G.; Le Minor, L. & Chalon, A.M. — Antigènes somatiques et flagellaires des *Yersinia enterocolitica*. *Annls Inst. Pasteur*, 120:631-642, 1971.
  35. Wauters, G.; Le Minor, L.; Chalon, A.M. & Lassen, J. — Supplément au schéma antigenique de *Yersinia enterocolitica*. *Annls Inst. Pasteur*, 122:951-956, 1972.
  36. Weaver, R.E. & Jordan, J.G. — Recent human isolates of *Yersinia enterocolitica* in the United States. In: International Symposium on *Yersinia, Pasteurella* and *Francisella*, Malmo, Apr. 10-12, 1972. Proceedings, Basel, S. Karger, 1973. p. 120-125.
  37. Wetzler, T.F.; Eitzen, H.E.; Currie, J.A. & Marshall, J.D. — Lipopolysaccharide-like antigens from *Pasteurella pseudotuberculosis* shared by various genera of *Enterobacteriaceae* as demonstrated by hemagglutination tests. In: International Symposium on *Pseudotuberculosis*, 20th, Paris, July 24-26, 1967. Proceedings, Basel, S. Karger, 1968. p. 155-166.
  38. Winblad, S. — Studies on O-antigen factors of *Yersinia enterocolitica*. In: International Symposium on *Pseudotuberculosis*, 20th, Paris, July 24-26, 1967. Proceedings, Basel, S. Karger, 1968. p. 337-342.
  39. Winblad, S. — Studies on O-serotypes of *Yersinia enterocolitica*. In: International Symposium on *Yersinia, Pasteurella* and *Francisella*, Malmo, Apr. 10-12, 1972. Proceedings, Basel, S. Karger, 1973. p. 27-37.

## **Resistance to mercury in enteric organisms: frequency and genetic nature\***

Maria Henriqueta Lemos dos Reis\*

Maria Judite Caram Ramos

& Luiz Rachid Trabulsi

### **Summary**

The distribution of Hg-resistance in enterobacteria and its association with the resistance to sulfadiazine-antibiotics was studied. 870 strains were investigated: 138 were resistant to mercury. Resistant strains belonged to genera *Klebsiella* (43.5%), *Citrobacter* (33.3%), *Escherichia* (16.3%), *Salmonella* (13.8%) and *Shigella* (8.1%). Only 1.2% of *Proteus* strains were resistant to mercury. No resistant strains were found in the genus *Providencia* or in the species *S. typhi*. 77.5% of Hg-resistant strains were also resistant to sulfadiazine and several antibiotics. In *Klebsiella*, however, 35.7% of strains were resistant only to mercury. 68% out of 128 Hg-resistant strains carried transferable R factors. Drug-resistance patterns in the recombinants obtained by conjugation varied from that of the donor strain with the exception of *S. flexneri* recombinants. Mercury resistance was transferred simultaneously with the lactose fermentation determinants in six strains of *Klebsiella* and one of *Enterobacter*, these characteristics being segregated simultaneously in *E. coli* K12. Hence suggestion is made that these determinants are located on the same plasmid.

### **Resumo**

#### *Resistência de enterobactérias ao mercúrio: freqüência e natureza genética*

Foi estudada, em enterobactérias, a distribuição da resistência ao mercúrio e sua associação com a resistência à sulfadiazina e vários antibióticos. De 870 amostras estudadas, 138 (15,9%) foram resistentes ao mercúrio, estando a resistência distribuída nos gêneros *Klebsiella* (43,5%), *Citrobacter* (33,3%), *Escherichia* (16,3%), *Salmonella* (13,8%) e *Shigella* (8,1%). Das amostras de *Proteus*, apenas duas de *P. rettgeri* (1,2%) apresentaram resistência ao mercúrio, enquanto que no gênero *Providencia* e na espécie *S. typhi* não foram encontradas amostras resistentes. Das 138 amostras resistentes ao mercúrio, 107 (77,5%) foram resistentes a sulfadiazina-antibióticos. Foram mais frequentes as amostras com resistência simultânea a três ou mais drogas. Em *Klebsiella*, entretanto, 35,7% das amostras apresentaram resistência exclusiva ao mercúrio. A resistência ao mercúrio foi transferível, por conjugação, em 68,0% das amostras. Quando a resistência era associada à resistência a sulfadiazina-antibióticos, os modelos de resistência dos recombinantes variaram em todos os gêneros, com exceção daqueles obtidos com as amostras de *S. flexneri*. Em seis amostras de *Klebsiella* e uma de *Enterobacter*, a resistência ao mercúrio foi transferível simultaneamente com os determinantes de fermentação da lactose, estas duas características segregando simultaneamente em *E. coli* K12. Estes dados sugerem que os determinantes genéticos da resistência ao mercúrio e fermentação da lactose estão situados em um só elemento genético, de natureza extracromossômica.

### **Introduction**

Bacterial resistance to mercury salts has been studied in correlation with the source of strains, their sensitivity to bacteriophages and their multiple resistance to antibiotics and other drugs (4, 6, 18, 26).

*Plasmid* — mediated resistance to mercury in association with other heavy-metals and antibiotics has been observed in *Staphylococcus aureus* (10, 11, 12, 14) and in enteric bacilli, specially *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* (13, 18).

The mechanism of mercury resistance has

\* Parte da tese de mestrado de Maria Henriqueta Lemos dos Reis realizada com auxílio da FAPESP, CNPq e CAPES. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu, 862, 3º andar, São Paulo, SP.

also been studied by several workers. In *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and several species of *Pseudomonas*, it is reported as due to reduction of mercury compounds to an inactive form, via a mechanism which is inducible by mercuric or mercurial compounds (5, 8, 17, 19, 20). In the present paper, we investigated the frequency of mercury resistance in different genera of *Enterobacteriaceae*, the genetic nature of such resistance and the association of this characteristic with the resistance to sulfadiazine and antibiotics.

## Material and Methods

**Determination of resistance** — Drug resistance was determined by the plate-dilution method (23) with the use of mercuric chloride ( $HgCl_2$ ), sulfadiazine (Su), streptomycin (Sm), tetracycline (Tc), chloramphenicol (Cm), Kanamycin (Km), ampicillin (Ap) and nalidixic acid (Nal). Nutrient agar CM<sub>3</sub> (Oxoid) was used for testing resistance to mercury (Hg) and antibiotics. Resistance to Su was tested in the minimal medium of Clowes & Hayes (2). When studying *Shigella flexneri*, nicotinamide (1  $\mu$ g/ml) was added to the minimal medium. Sterile stock solutions of the drugs in appropriate diluents were kept at -20°C before use. Final concentrations in the plates ranged from 1 to 1000  $\mu$ g/ml for the antibiotics and Su, and from 1 to 100  $\mu$ g/ml for  $HgCl_2$ . Incubation was at 37°C for 24 or 48 hours. Resistant strains had growth responses at least half of that observed in control plates without the drug.

**Selection of donor strains for conjugation** — All Hg-resistant strains were included as donors with the exception of the resistant strains of *Shigella sonnei* which frequently produced active colicins against the recipient strains as well as other enterobacteria simultaneously resistant to Hg and Nal. A strain was considered resistant to Hg when it was able to grow in 10-20  $\mu$ g/ml of  $HgCl_2$ . Resistant strains to sulfadiazine-antibiotics were selected as described by Trabulsi & col. (24). A total of 128 strains were selected as donors, as follows: 16 of *S. flexneri*, 12 of *S. typhimurium*, two of *S. derby*, one of *S. cholera suis* and one of *Salmonella* sp; eight of *E. coli* 0111, seven of *E. coli* 0119 and one of a serologic undetermined *E. coli*; 70 of *Klebsiella* sp; eight of *Citrobacter* sp and two of *P. rettgeri*. The strains were grou-

ped into two classes: 92 resistant only to Hg and 36 simultaneously to Hg and to sulfadiazine-antibiotics.

**Recipient strains** — The following strains were used: a) *E. coli* K12F- pro met Nal<sup>R</sup>, b) *E. coli* K12 F- lac Nal<sup>R</sup> Sm<sup>R</sup> and c) *E. coli* K12 F- lac X<sub>74</sub> Nal<sup>R</sup>. The first two strains were derived from *E. coli* K12 J53, kindly supplied by Dr. Naomi Datta, Hammersmith Hospital, London. Strain c was derived from *E. coli* K12 RV/F' lac obtained from Dr. Werner K. Maas, Medical Center, New York University, New York. Nalidixic acid resistant strains were obtained by the method of Szybalski & Bryson (21). Unless otherwise indicated, the recipient strains were sensitive to sulfadiazine-antibiotics.

**Transfer of resistance markers** — Transfer of resistance markers was carried out by conjugation (25). Mercury resistance was transferred to recipient strains a or b depending on the ability of lactose fermentation by the donor strains. For transfer of resistance determinants of all other drugs recipient strains a and c were used. The conjugation time was 24 hours, either when the donor strains were unable to transfer their drug-resistance markers after five hours, or when the number of recombinants was too small within this period. To determine the frequency of Hg-resistance transfer and that of lactose fermentation determinants in *Klebsiella* and *Enterobacter* strains, the conjugation time was two hours.

The selection of recombinants resistant to Hg, Tc, Cm, Km or Ap was performed on MacConkey CM115 (Oxoid) agar plates. The minimal medium of Clowes & Hayes (2) was used to select for Su resistant recombinants and nutrient agar CM3 (Oxoid) for Sm ones. Antibiotics and  $HgCl_2$  were added at a final concentration of 10  $\mu$ g/ml in the selective plates. Streptomycin was, nevertheless, added at 2.5 or 3.5  $\mu$ g/ml and Su at 1000  $\mu$ g/ml. Controls were run to determine both mutations of the recipient strain and incompatibility between the donor and recipient strain.

To determine the degree of co-transfer of resistance markers, 12 clones of the recipient strains on the selective plate were purified in the same medium and inoculated on to nutrient agar plates. Replica plating was then made to plates containing the drugs in appropriate concentrations.

## Results

**Frequency of Hg-resistance** — 138 (15.9%) out of 870 strains of enterobacteria isolated from clinical sources were resistant to Hg (Table 1). *Klebsiella* and *Citrobacter* comprised the highest proportions of Hg-resistant strains. Among the strains of *Salmonella* 24.2% of Hg-resistant were of *S. typhimurium*. All strains of *S. typhi* were sensitive to mercury. Among 161 strains of *Proteus* only two of *P. rettgeri* were Hg-resistant.

**Table 1** — Frequency of mercury resistance in enteric bacteria

Genus	Nº of strains	Resistant strains	
		Nº	%
<i>Escherichia</i>	104	17	16.3
<i>Shigella</i>	233	19	8.1
<i>Salmonella</i>	159	22	13.8
<i>Citrobacter</i>	24	8	33.3
<i>Klebsiella</i>	161	70	43.5
<i>Proteus</i>	161	2	1.2
<i>Providencia</i>	28	0	0.0
Total	870	138	15.9

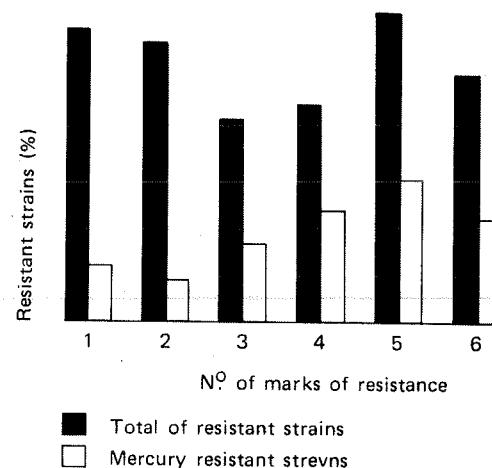
**Mercury-resistance and resistance to sulfadiazine-antibiotics** — Among the 138 Hg-resistant strains, 107 (77.5%) were also resistant to sulfadiazine-antibiotics (Table 2). Resistance to Hg alone was found in 35.7% of *Klebsiella* strains.

Mercury resistance was usually associated with resistance to 1, 2, 3, 4, 5 or 6 of the other drugs (Fig. 1), depending on the particular strain and on the bacterial genus.

**Table 2** — Association between mercury resistance and resistance to sulfadiazine-antibiotics

Strains	Total	Hg-resistant strains		Nº	%		
		Mercury and sulfadiazine/ antibiotics					
		Mercury only	Mercury and sulfadiazine/ antibiotics				
		Nº	%	Nº	%		
<i>Escherichia</i>	17	15	88.2	2	11.8		
<i>Shigella</i>	19	17	89.5	2	10.5		
<i>Salmonella</i>	22	21	95.5	1	4.5		
<i>Citrobacter</i>	8	7	87.5	1	12.5		
<i>Klebsiella</i>	70	45	64.3	25	35.7		
<i>Proteus</i> (rettgeri)	2	2	100.0	0	0.0		
Total	138	107	77.5	31	22.5		

**Fig. 1** — Association between resistance to mercury and N° of marks of resistance to sulfadiazine-antibiotics



**Transfer of the Hg-resistance determinants** — Among 128 strains, 68% were able to transfer their Hg-resistant marker to *E. coli* K12 (Table 3). The percentages of strains of *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella* and *Salmonella* that were able to transfer R factors containing genes responsible for Hg-resistance were 87.5, 75.0, 74.3 and 50.0% respectively. No strains of *Citrobacter* was able to transfer its Hg-resistance determinants.

**Table 3** — Frequency of transferable resistance to mercury in enteric organisms

Strains	Nº of strains	Strains with transferable resistance	
		Nº	%
<i>Escherichia</i>	16	14	87.5
<i>Shigella</i>	16	12	75.0
<i>Salmonella</i>	16	8	50.0
<i>Citrobacter</i>	8	0	0.0
<i>Klebsiella</i>	70	52	74.3
<i>Proteus</i> (rettgeri)	2	1	50.0
Total	128	87	68.0

**Co-transfer of Hg and sulfadiazine-antibiotics markers** — In experiments to determine the co-transfer of determinants to Hg-resistance and the resistance to sulfadiazine-antibiotics, the following results emerged. All clones of the recipient strain which received the Hg-resistance marker also incorporated the determinants of resistance to one or more antibiotics. The on-

ly exception was observed in the conjugation experiments with *P. rettgeri*, in which only the Hg-resistance determinant was transferred. Clones of the recipient bacteria showed always the same drug-resistance pattern as the donor strains in the case of conjugation experiments

with *S. flexneri* strains. In conjugation experiments with *E. coli*, *Klebsiella* and *Salmonella*, the resistance patterns of clones of the recipient strain varied. In most cases, these patterns differed from those of the donor strains (Tables 4, 5 and 6).

**Table 4** — Co-transfer of mercury resistance and resistance to sulfadiazine-antibiotics in *E. coli* 0119 strains

Donor strains and patterns of resistance	Selective drug/Recombinants					
	Hg	Su	Sm	Tc	Cm	Km
<i>E. coli</i> 0119/16 (HgSuSmTcCmKm)	HgSuSm HgSuSmTcCmKm	HgSuSm HgSuSmTcCmKm	HgSuSm HgSuSmTcCmKm	HgSuSmTcCmKm	HgSuSmTcCmKm	HgSuSmTcCmKm
<i>E. coli</i> 0119/23 (HgSuSmTcCmKm)	HgSuSmCmKm	HgSuSm HgSuSmCmKm	HgSuSmCmKm	HgSuSmTc HgSuSmTcCmKm	HgSuSmCmKm	HgSuSmCmKm
<i>E. coli</i> 0119/30 (HgSuSmTcCmKm)	HgSuSmCm HgSuSmCmKm	HgSuSmCm HgSuSmCmKm	HgSuSm HgSuSmCmKm	HgSuSmTc HgSuSmTcCmKm	HgSuSmCmKm	HgSuSmCmKm
<i>E. coli</i> 0119/33 (HgSuTcCmKm)	HgSu HgSuCmKm	HgSuCmKm	HgSuTcCmKm	HgSuTc HgSuCmKm	HgSuCmKm	
<i>E. coli</i> 0119/1 (HgSuTcCmKm)	HgSuTcCmKm	HgSu HgSuTcCmKm		HgSuTcCmKm	HgSuTcCmKm	HgSuTcCmKm
<i>E. coli</i> 0119/26 (HgSuTcCmKm)	HgSu HgSuTcCmKm	HgSuTcCmKm		HgSuTcCmKm	HgSuTcCm HgSuTcCmKm	HgSuTcCmKm
<i>E. coli</i> 0119/34 (HgSuTcCmKm)	Su			HgSuTcCmKm		HgSuTcCmKm
	HgSuTcCmKm	SuCm HgSuTcCmKm		HgSuTcCmKm	HgSuTcCmKm	HgSuTcCmKm

**Table 5** — Co-transfer of mercury resistance and resistance to sulfadiazine-antibiotics in *Klebsiella* strains

Donor strains and patterns of resistance	Selective drug/Recombinants					
	Hg	Su	Sm	Tc	Cm	Km
<i>Klebsiella</i> sp/069 (HgSuSmTcCcKm)	HgSuSmTcCc HgSuSmTcCcKm	HgSuSmCm HgSuSmTcCc	HgSuSmCm HgSuSmTcCc	HgSuSmTcCc HgSuSmTcCcKm	SuSmTcCc HgSuSmTcCc	HgSuSmTcCcKm
		HgSuSmTcCcKm	HgSuSmTcCcKm	HgSuSmTcCcKm	HgSuSmTcCcKm	
<i>Klebsiella</i> sp/055 (HgSuSmTcCcKmAp)	HgSuSmTcCcKm	SuSmTcCcKm HgSuSmTcCc HgSuSmTcCcKm	HgSuSmTcCcKm	HgSuSmTcCcKm	HgSuSmTcCc HgSuSmTcCcKm	HgSuSmTcCcKm
<i>Klebsiella</i> sp/080 6HgSuSmTcCcAp)	HgSuSmTcCc	HgSuSmTcCc	HgSuSmTcCc	HgSuSmTcCc	HgSuSmTcCc	
<i>Klebsiella</i> sp/035 (HgSuSmTcAp)	HgSuSmTc	HgSuSmTc	HgSuSmTc	HgSuSmTc		
<i>Klebsiella</i> sp/048 (HgSuCmKm)	HgSuCmKm	HgSuCmKm			SuCmKm HgSuCmKm	HgSuCmKm
<i>Klebsiella</i> sp/011 (HgSuCmKm)	HgSuCmKm	HgSuCm HgSuKm HgSuCmKm			HgSuCmKm	HgSuCmKm
<i>Klebsiella</i> sp/110 (HgAp)	Hg					not detected

**Table 6** — Co-transfer of mercury resistance and resistance to sulfadiazine-antibiotics in *Salmonella* strains

Donor strains and patterns of resistance	Selective drug/Recombinants						
	Hg	Su	Sm	Tc	Cm	Km	Ap
<i>S. typhimurium</i> /217 (HgSuSmTcCmKmAp)	HgCm HgTcCm HgTcCmKm	SuSmAp	SuSmAp	TcKm HgTcCmKm	CmKm TcCmKm HgTcCmKm	km CmKm TcKm HgTcCmKm	SuSmAp
<i>S. typhimurium</i> /220 (HgSuSmTcCmKmAp)	HgKm	SuSmAp	SuSmAp	Tc TcKm HgTcCmKm	HgTcCmKm	TcKm HgKm	SuSmAp
<i>S. typhimurium</i> 135 (HgSuSmTcCmKmAp)	Hg HgTcCmKm	SuSmAp	SuSmAp	HgTcCmKm	HgTcCmKm	HgTcCmKm	Ap SuSmAp
<i>S. typhimurium</i> /122 (HgSuSmCmKmAp)	HgCm HgCmKm	SuSmAp	SuSmAp		HgCm HgCmKm	Km HgCmKm	Ap SuSmAp
<i>S. derby</i> /104 (HgSuSmCmKmAp)	HgKm HgSuSmKm	SuSm HgSuSmKm	SuSm HgSuSmKm		HgCmAp HgCmKmAp HgSuSmCmAp HgSuSmCmKm HgSuSmCmKmAp	HgKm HgSuSmKm	HgSuAp HgCmAp HgSuSmAp HgSuSmCmKmAp
<i>S. derby</i> /120 (HgSuSmCmKmAp)	HgKm HgSuSmKm	SuSm HgSuSmKm	SuSm HgSuSmKm		HgSuSmCmKmAp	HgKm	HgSuAp HgCmAp HgSuSmAp HgSuSmKmAp
<i>S. typhimurium</i> /97 (HgSuSmCmAp)	HgCm	SuSmAp	SuSmAp		HgCm		Ap SuSmAp

**Co-transfer of Hg-resistance and lac markers —** Six strains of *Klebsiella* and one of *Enterobacter* were able to transfer the Hg-resistance determinants among with the determinants for lactose fermentation. Clones with these characteristics were selected in MacConkey agar plates containing HgCl<sub>2</sub>. The frequencies of co-transfer of the two phenotypes are shown in Table 7. All strains were resistant only to mercury. Preliminary experiments on the segregation of these markers in *E. coli* recombinants, showed that all lac- segregants were sensitive to Hg whereas all lac+ colonies were Hg-resistant.

**Table 7** — Co-transfer of mercury-resistance and the character lac in *Klebsiella-Enterobacter* strains

Crosses	Donor number	Recombinants number (Hg <sup>R</sup> lac <sup>+</sup> )	Frequency of transfer
<i>Enterobacter</i> sp/163 x K12	2.9 x 10 <sup>8</sup>	1.0 x 10 <sup>3</sup>	3.4 x 10 <sup>-6</sup>
<i>Klebsiella</i> sp/128 x K12	2.9 x 10 <sup>8</sup>	4.0 x 10 <sup>2</sup>	1.4 x 10 <sup>-6</sup>
<i>Klebsiella</i> sp/117 x K12	2.9 x 10 <sup>8</sup>	7.0 x 10 <sup>2</sup>	2.3 x 10 <sup>-6</sup>
<i>Klebsiella</i> sp/142 x K12	2.9 x 10 <sup>8</sup>	5.0 x 10 <sup>2</sup>	1.7 x 10 <sup>-6</sup>
<i>Klebsiella</i> sp/113 x K12	2.5 x 10 <sup>8</sup>	2.5 x 10 <sup>2</sup>	1.0 x 10 <sup>-6</sup>
<i>Klebsiella</i> sp/137 x K12	2.5 x 10 <sup>8</sup>	4.5 x 10 <sup>2</sup>	1.8 x 10 <sup>-6</sup>
<i>Klebsiella</i> sp/176 x K12	2.5 x 10 <sup>8</sup>	1.0 x 10 <sup>2</sup>	4.0 x 10 <sup>-7</sup>

## Discussion

It was found that 138 (15.9%) out of 870 strains of enterobacteria isolated from clinical sources were resistant to mercury. Except for *Providence* all other genera, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Citrobacter* and *Proteus* had species showing mercury-resistance. It is noteworthy that no strains of *S. typhi*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* or *P. morganii* were found to be resistant to mercury. The absence of mercury resistance in strains of *S. typhi*, *Providence*, and *Proteus* could be due either to intrinsic properties of these microorganisms or to a weak exposition of these bacteria to mercury and/or antibiotics and sulfadiazine. If there is a weak selective pressure on less frequent bacteria such as *S. typhi*, *Providence* and *P. vulgaris*, the same situation is hardly the case with ubiquitous microorganisms such as *P. mirabilis* and *P. morganii*. Otherwise, *Proteus* and *Providence* usually differ from the other enterobacteria in several characteristics (3, 7), including resistance to antibiotics (16).

Resistance to mercury was associated with sulfadiazine-antibiotics resistance in most strains. Only the genus *Klebsiella* comprised quite

a few strains with an exclusive resistance to mercury. Mercury resistance was transferable in most strains, R factors been isolated with different drug-resistance determinants. Co-transfer results (Tables 4, 5 and 6) strongly suggested that mercury and sulfadiazine-antibiotics determinants were carried by the same R factor since all clones of recipient strain, with a few exceptions, were simultaneously resistant to mercury and sulfadiazine-antibiotics, regardless of the resistance pattern of the clone and of the original plate where it was selected from.

Since sulfadiazine and antibiotic-resistant strains of enterobacteria are very frequent (23, 24), it should be interesting to know the role of mercury salts in selecting for drug-resistant strains. Conversely, since there are R factors mediating multiple drug resistance, mercury-resistant strains could be isolated by selection for antibiotic resistance.

The segregation of resistance markers observed in *E. coli* recipient strain in relation to donor strains (Tables 4, 5 and 6) may be related to

one or more of the following mechanisms: a) the existence of two or more R factors in the donor strains as shown by Tanaka & col., in *Shigella* (22) and by Romero & Meynell in *Salmonella* strains (15); b) the occurrence of plasmid aggregates in the donor strains as proposed by Milliken & Clowes (9) or; c) the dissociation of co-integrated R factors as has been shown to occur in *P. mirabilis* (1).

The observation that six strains of *Klebsiella* and one of *Enterobacter* transfer their mercury resistance simultaneously with the determinants of lactose fermentation suggests that these strains harbor a genetic element, probably an extracromosomal one, carrying genes related to those two characteristics. Segregation experiments with *E. coli* recipient strain (data not shown) support the suggestion that the genes are on the same element since the inability to ferment lactose is always accompanied by loss of mercury-resistance.

The study of the genetic characteristics of this element is in progress.

## References

- Clowes, R.C. — Molecular structure of bacterial plasmids. *Bacteriol. Rev.*, 36:361-405, 1972.
- Clowes, R.C. & Hayes, W. — Experiments in microbial genetics. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1968. P. 184-185 (Appendix A<sub>4-7</sub>).
- Datta, N. & Hedges, R.W. — Host ranges of R factors. *J. Gen. Microbiol.*, 70:453-460, 1972.
- Dyke, K.G.H.; Parker, M.T. & Richmond, M.H. — Penicillinase production and metal-ion resistance in *Staphylococcus aureus* cultures isolated from hospital patients. *J. Med. Microbiol.*, 3:125-136, 1970.
- Furukawa, K. & Tonomura, K. — Metallic mercury releasing enzyme in mercury-resistant *Pseudomonas*. *Agr. Biol. Chem.*, 36:217-226, 1972.
- Groves, D.J.; Short, H.; Thewaini, A.J. & Young, F.E. — Epidemiology of antibiotic and heavy metal resistance in bacteria: resistance patterns in staphylococci isolated from populations in Iraq exposed and not exposed to heavy metals or antibiotics. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 7:622-628, 1975.
- Jones, D. & Sneath, P.H.A. — Genetic transfer and bacterial taxonomy. *Bacteriol. Rev.*, 34:40-81, 1970.
- Kondo, I.; Ishikawa, T. & Nakahara, H. — Mercury and cadmium resistance mediated by the penicillinase plasmid in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 117:1-7, 1974.
- Milliken, C.E. & Clowes, R.C. — Molecular structure of an R factor, its component drug resistance determinants and transfer factor. *J. Bacteriol.*, 113:1026-1033, 1973.
- Moore, B. — A new screen test and selective medium for the rapid detection of epidemic strains of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 2:453-458, 1960.
- Novick, R.P. — Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*. *Fed. Proc.*, 26:29-38, 1967.
- Novick, R.P. & Roth, C. — Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 95:1335-1342, 1968.
- Pohl, P.; Laub-Kuperszty, R. & Thomas, J. — Resistance au mercure et aux antibiotiques chez les entérobactéries pathogènes. *Med. Mal. Infect.*, 4:569-573, 1974.
- Richmond, D.H. & John, M. — Cotransduction by a Staphylococcal phage of the genes responsible for penicillinase synthesis and resistance to mercury salts. *Nature (London)*, 202:1360-1361, 1964.
- Romero, E. & Meynell, E. — Covert fi<sup>-</sup> R factors in fi<sup>+</sup> R<sup>+</sup> strains of bacteria. *J. Bacteriol.*, 97:780-786, 1969.
- Santos, D.S. — Resistência transmissível a drogas na família *Enterobacteriaceae*. São Paulo, Tese-Mestrado, Escola Paulista de Medicina, 1972.
- Schottel, J.; Mandal, A.; Clark, D.; Silver, S. & Hedges, R.W. — Volatilization of mercury and organomercurials determined by inducible R-factor systems in entericbacteria. *Nature*, 251:335-337, 1974.
- Smith, D.H. — R factors mediate resistance to mercury, nickel and cobalt. *Science*, 156:1114-1116, 1967.
- Summers, A.O. & Lewis, E. — Volatilization of mercuric chloride by mercury-resistant plasmid-bearing strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 113:1070-1072, 1973.
- Summers, A.O. & Sugarman, L.I. — Cell-free mercury (II) reducing activity in a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 119:242-249, 1974.

21. 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.
22. Tanaka, T.; Hashimoto, H.; Nagai, Y. & Mitsuhashi, S. — Drug resistance of enteric bacteria. XI — Isolation of *Shigella* strains in hetero-R state. *Jap. J. Microbiol.*, 11:155-162, 1967.
23. Trabulsi, L.R. & Zuliani, M.E. — Estudos sobre a *E. coli* 0111:B<sub>4</sub>. III — Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e a seis antibióticos. *Rev. Inst. Med. trop., (São Paulo)*, 11:323-334, 1969.
24. Trabulsi, L.R.; Zuliani, M.E. & Toledo, M.R.F. — Resistance to nine drug of *Shigella* strains isolated in São Paulo between 1963 and 1968. *Rev. Microbiol.*, 1:71-77, 1970.
25. 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, 10:202-220, 1964.
26. Williams, R.F. — Some features of antibiotic resistance in Staphylococci: Mercury resistance and multiple antibiotic resistance. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 64:540-544, 1971.

## Influência da resistência cromossômica e extracromossômica a drogas no crescimento de *Escherichia coli*

Darci Satsuki Aoki Watanabe\*

### Resumo

Curvas de crescimento de *E. coli*, respectivamente sensível e resistente a drogas por mutação e fatores R, revelam que: a presença do fator R na célula reduz, discretamente, a capacidade de crescimento; as mutações para tetraciclina, cloranfenicol e canamicina prejudicam o crescimento nas fases inicial e logarítmica, sobretudo na primeira, enquanto que as mutações para estreptomicina, sulfadiazina e ácido nalidíxico, particularmente as duas últimas, não interferem com o crescimento, quando se compara com a amostra sensível. O fenômeno é estatisticamente comprovado.

### Summary

*Influence of chromosomal and extrachromosomal drug resistance in Escherichia coli growth.*

Growth curves determined in the complex and minimal media of *E. coli* sensitive and drug resistant by R factor and mutation, reveal that: the presence R factor in the cell provoke a discrete reduction in growth capacity; the mutations to tetracycline, chloramphenicol and kanamycin impair more specifically the lag-phase than the exponential growth; the mutations to streptomycin, sulphadiazine and nalidixic acid, particularly to the last two, do not interfere with bacterial multiplication when compared with the sensitive strain. The phenomenon is statistically proved.

### Introdução

A resistência bacteriana a drogas, por mutação ou aquisição de fatores extracromossômicos, tem sido exaustivamente demonstrada (3, 8, 9, 14, 15, 16) e já se sabe que a mutação pode causar mudanças na capacidade de crescimento das linhagens.

O estudo da resposta do crescimento à concentração sub-máxima de cloranfenicol, em linhagens de *Staphylococcus aureus*, revela que a amostra mais resistente apresenta maior dificuldade de crescimento, quando comparada à de resistência inferior (11). Em contraposição, outros autores verificaram que mutantes resistentes à estreptomicina (5) e à benzil-penicilina (10) demonstram crescimento exuberante, tanto na presença como na ausência da droga, em relação à amostra original, sensível.

Em *Escherichia coli*, mutantes resistentes à estreptomicina apresentam taxas de crescimento menores do que às de linhagens sensíveis, tanto para o meio complexo como para o meio mínimo (1, 2, 6). *E. coli* K12, com altos níveis de resistência ao cloranfenicol, exibe tempo de geração de 100 minutos, mesmo na ausência da droga, enquanto que na amostra sensível é de 30 minutos (17).

O papel do fator R sobre o crescimento também tem sido examinado. Em *Salmonella typhimurium* R<sup>-</sup>, foram efetuadas transferências de vários fatores R, concluindo-se que as amostras R<sup>+</sup> exibem, de modo geral, menor velocidade de crescimento. A redução da taxa de crescimento varia de acordo com o tipo de fator R (23).

Sabendo-se que a multirresistência a drogas, induzida por mutações simples, dupla e tripla,

\* Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola do Campus de Botucatu, Caixa Postal 102, 18610 RUBIÃO JÚNIOR SP.

provoca retardo no crescimento, investiga-se, no presente trabalho, a influência das mutações e dos fatores R em *E. coli* 0111:B4:H2, em relação aos diversos tipos de drogas antimicrobianas utilizadas.

## Material e Métodos

**Amostras** — Foram utilizadas linhagens resistentes derivadas de *Escherichia coli* 0111:B4:H2, lactose positiva, resistente a 1 µg/ml de estreptomicina (E), tetraciclina (T), cloranfenicol (C), canamicina (K), ácido nalidíxico (An) e a 20 µg/ml de sulfadiazina (Su).

**Obtenção de mutantes** — Foi empregada a técnica de Szybalski & Bryson (18) para a obtenção de mutantes à estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, canamicina e ácido nalidíxico, utilizando-se como meio de cultura o D.S.T. Agar Base-Oxoid e o Mueller Hinton Agar-Macknur, quando da obtenção de mutantes à sulfadiazina.

**Determinação do nível de resistência** — Empregou-se a técnica da diluição em placa (22), nas concentrações de droga equivalentes a: 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 µg/ml de sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, canamicina e ácido nalidíxico, sendo utilizados os mesmos meios de cultura para a obtenção de mutantes.

A concentração da droga, imediatamente inferior à que impedia o crescimento bacteriano, indicava o nível de resistência do mutante.

**Mutantes empregados** — Para realização das curvas de crescimento, foram selecionadas linhagens resistentes aos antibióticos e quimioterápicos, nas seguintes concentrações: 50, 100, 200, 500 e 1000 µg/ml de sulfadiazina, estreptomicina e ácido nalidíxico; 50, 100, 200 e 300 µg/ml de tetraciclina; 50, 100, 300, 400 e 500 µg/ml de cloranfenicol e de 50, 100, 200, 300 e 1000 µg/ml de canamicina.

**Obtenção de linhagens resistentes por aquisição de fatores R** — Foram selecionadas três linhagens de *Escherichia coli* K12J5, lac<sup>+</sup>, pro-, met e portadoras de fatores R, com resistência para sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e canamicina. O fator R, presente nessas linhagens, foi transferido para

*Escherichia coli* 0111:B4:H2, por conjugação (7). Utilizou-se, como placa seletora, o agar acetato de sódio (21), contendo 20 µg/ml de tetraciclina e o crescimento presente foi purificado em MacConkey Agar-Oxoid. Após a identificação sorológica da *Escherichia coli* 0111:B4:H2, procedeu-se a determinação dos níveis de resistência às drogas citadas.

A capacidade de crescimento foi testada na linhagem resistente a 1000 µg/ml de sulfadiazina, 50 µg/ml de estreptomicina, 500 µg/ml de tetraciclina, 100 µg/ml de cloranfenicol e 500 µg/ml de canamicina.

**Curvas de crescimento — Meios de Cultura** — A habilidade de crescimento das amostras foi pesquisada em meio complexo (Brain Heart Infusion-Oxoid) e em meio mínimo (fosfato monoácido de sódio, 105g; fosfato diácido de sódio, 45g; citrato de sódio, 4,7g; sulfato de magnésio anidro, 0,5g; sulfato de amônio, 10g; glicose, 2g e água destilada, 1000ml).

**Padronização do inóculo e controle do crescimento bacteriano** — As amostras resistentes foram semeadas em 10ml de meio complexo e de meio mínimo, contendo a droga antibacteriana. Para o primeiro meio, os tubos foram incubados a 37°C, por 24 horas; para o segundo, por 36 horas. Utilizou-se o crescimento de 24 horas com relação à amostra sensível e à portadora de fator R, para ambos os meios, sem adição da droga. Após centrifugação dos crescimentos a 3000 rpm, durante 10 minutos, o sedimento foi homogeneizado em solução salina 0,15M esterilizada e padronizado para 20 unidades nefelométricas (U. N.). Para a realização das curvas de crescimento, 0,1ml da suspensão era adicionado em cada tubo que continha 10ml de meio complexo ou de meio mínimo, sem droga, previamente aquecidos a 37°C. Após leitura inicial, os tubos eram incubados em banho-maria a 37°C e retirados somente para posteriores determinações. Para o controle do crescimento bacteriano, foram efetuadas medidas da concentração bacteriana em Nefelômetro (Evans Eletroselenium Ltda., England). As leituras foram expressas em unidades nefelométricas e feitas no início da experiência e após intervalos de 30 minutos para o meio complexo e de uma hora para o meio mínimo.

**Parâmetros da curva de crescimento** — Sendo X<sub>0</sub> a concentração celular, no início da fase

exponencial, e  $X$  a concentração no instante  $t$ , tem-se:

$$X = X_0 \cdot e^{\alpha t} \quad (a)$$

onde  $\alpha$  é a velocidade específica de crescimento do microrganismo nas condições do ensaio. Através da regressão linear aplicada aos valores  $X$  e  $t$ , na equação  $a$ , determina-se  $\alpha$ .

Assim:

$$\log X = \log X_0 + \frac{\alpha}{2,303} \cdot t \quad (b)$$

Conhecendo  $\alpha$ , calcula-se o tempo de geração ( $G$ ), por meio da equação  $a$ , resultando:

$$G = \frac{0,693}{\alpha} \quad (c)$$

A taxa de crescimento ( $R$ ), em termos de número de gerações, na unidade de tempo, será:

$$R = \frac{1}{G} \quad (d)$$

Para representar todas as fases de uma cultura em crescimento, os dados experimentais foram projetados em papel milimetrado.

## Resultados

**Crescimento da linhagem sensível ( $S$ ) e da portadora de fator R ( $R^+$ )** — Observa-se que a duração média da "lag"-fase, no meio complexo, foi praticamente a mesma para as duas linhagens, sendo idêntica para o meio mínimo (Tabela 1). Quanto à capacidade de cresci-

**Tabela 1** — Valores encontrados para "lag"-fase, taxa de crescimento ( $R$ ) da linhagem sensível ( $S$ ) e da portadora de fator R ( $R^+$ ) em meio complexo e em meio mínimo

MEIO COMPLEXO				MEIO MÍNIMO			
"Lag"-fase (h)		R (G/h)		"Lag"-fase (h)		R (G/h)	
$S$	$R^+$	$S$	$R^+$	$S$	$R^+$	$S$	$R^+$
1,50	1,50	2,60	2,50	2,50	2,00	1,03	0,90
2,00	2,00	2,88	2,60	2,50	2,50	0,89	0,83
1,75	1,75	2,74	2,43	2,00	1,50	0,88	0,86
1,75	1,75	2,88	2,57	2,00	2,50	0,94	0,96
1,50	1,75	2,96	3,39	2,00	2,50	1,00	0,98
1,50	2,00	2,48	2,98	2,00	2,00	0,94	0,86
2,00	1,75	3,42	3,06	2,50	2,50	1,02	1,00
2,00	2,00	3,34	3,11	2,00	2,00	1,01	0,94
1,50	1,50	3,26	3,28				

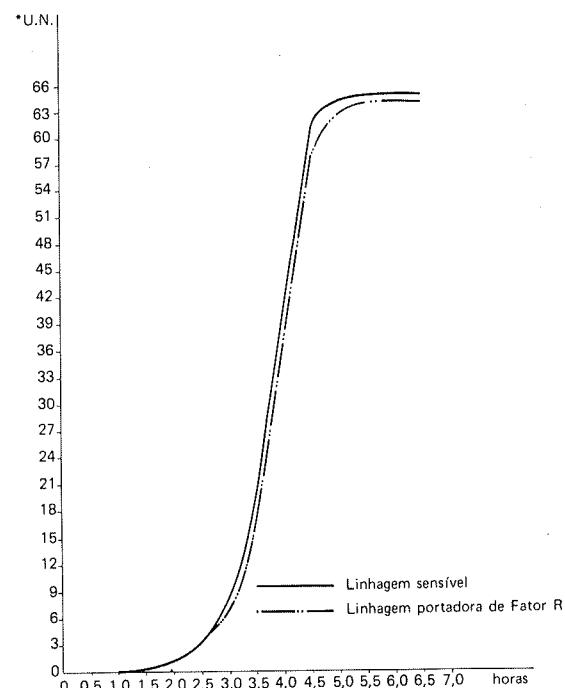
$$\bar{x} = 1,72 \text{ h} \quad \bar{x} = 1,77 \text{ h} \quad \bar{x} = 2,95 \quad \bar{x} = 2,88 \quad \bar{x} = 2,18 \text{ h} \quad \bar{x} = 2,18 \text{ h} \quad \bar{x} = 0,96 \text{ h} \quad \bar{x} = 0,91 \text{ h}$$

$$s = 0,23 \quad s = 0,19 \quad s = 0,33 \quad s = 0,38 \quad s = 0,25 \quad s = 0,37 \quad s = 0,05 \quad s = 0,06$$

$$\text{Teste } t = -0,54 \quad \text{Teste } t = -0,42 \quad (\text{N.S.}) \quad \text{Teste } t = 0,70 \quad (\text{N.S.})$$

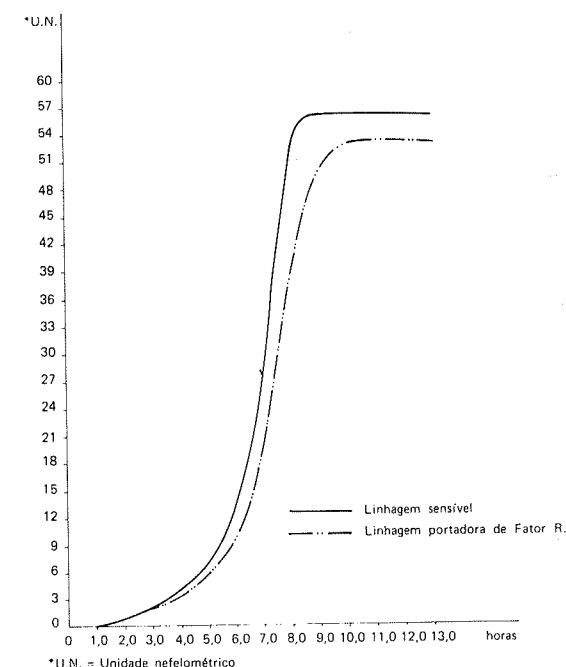
$\bar{x}$  = média  
 $s$  = desvio padrão  
 N.S. = não significativo  
 $G/h$  = número de gerações/hora

**Figura 1** — Curvas de crescimento de *Escherichia coli* sensível da portadora de fator R, em meio complexo



\*U.N. = Unidade nefelométrica

**Figura 2** — Curvas de crescimento de *Escherichia coli* sensível e da portadora de fator R, em meio mínimo



\*U.N. = Unidade nefelométrica

**Tabela 2** — Valores encontrados para "lag"-fase e taxa de crescimento, em meio complexo, de mutantes com diferentes níveis de resistência ( $\mu\text{g/ml}$ ) às drogas

Drogas Nível $\mu\text{g/ml}$	E		T		C		E		An		Su	
	"Lag"-fase	R										
50	1,50	3,04	3,50	1,76	2,00	2,46	3,50	2,77	2,00	2,81	1,75	3,13
100	2,00	2,96	3,50	1,64	2,75	2,87	4,50	2,04	2,00	3,12	2,00	3,39
200	2,50	2,01	4,00	1,51	2,75	3,46	3,50	1,91	1,50	2,21	1,75	3,04
300	—	—	2,00	2,15	2,50	2,66	4,50	2,13	—	—	—	—
400	—	—	—	—	3,00	2,96	—	—	—	—	—	—
500	2,25	1,73	—	—	—	2,85	—	—	2,00	3,05	2,00	2,18
1000	2,75	2,00	—	—	—	—	2,25	2,32	2,00	4,00	1,75	3,12
$\bar{x}$	2,20	2,35	3,25	1,76	2,66	2,88	3,65	2,37	1,90	3,04	1,85	3,17
s	0,48	0,60	0,86	0,27	0,37	0,33	0,92	0,33	0,22	0,64	0,13	0,12

E = estreptomicina

T = tetraciclina

C = cloranfenicol

An = ácido nalidíxico

Su = sulfadiazina

R = número de gerações/hora

$\bar{x}$  = média

s = desvio padrão

mento, os valores obtidos para a linhagem S são discretamente superiores aos da linhagem R<sup>+</sup> em ambos os meios. Entretanto, aplicando-se o teste t, aos valores obtidos para a "lag"-fase e taxa de crescimento, conclui-se que as diferenças não são significantes ao nível de 5%. As curvas de crescimento de ambas as linhagens nos meios citados estão ilustradas nas figuras 1 e 2.

*Relação entre o crescimento da linhagem sensível, da portadora de fator R e de mutantes resistentes às diferentes drogas* — Meio complexo — Os valores obtidos para "lag"-fase e taxa de crescimento são apresentados na Tabela 2 e os resultados da análise estatística na Tabela 3. Comparando-se os dados das Tabe-

las 1 e 2, observa-se que a duração média das "lag"-fases das linhagens S e R<sup>+</sup> foi semelhante à dos mutantes para a estreptomicina, sulfadiazina e ácido nalidíxico e acentuadamente menor do que a duração das "lag"-fases dos mutantes para a tetraciclina, o cloranfenicol e a canamicina, sendo a diferença significativa ao nível de 5% para as três últimas drogas. Em se tratando da taxa de crescimento, a linhagem S diferiu significantemente apenas dos mutantes para a tetraciclina e canamicina, e a linhagem R<sup>+</sup> só diferiu significativamente dos mutantes para a tetraciclina, no sentido de que os valores médios de suas taxas de crescimento foram superiores aos dos mutantes.

O exame das curvas de crescimento dos mutantes (Fig. 3) para a tetraciclina e a sulfadiazina revela que a última é bastante semelhante às das linhagens S e R<sup>+</sup>, enquanto que a curva do mutante para tetraciclina demonstra extenso período de "lag"-fase e menor intensidade de crescimento. As diferenças, quanto à "lag"-fase e à fase exponencial das curvas de crescimento dos mutantes à tetraciclina, à canamicina, à sulfadiazina e ao ácido nalidíxico, estão ilustradas na Fig. 4.

*Meio mínimo* — Os valores relativos à "lag"-fase e taxa de crescimento estão expressos na Tabela 4 e os resultados da análise estatística na Tabela 5. Observa-se que a duração média das "lag"-fases dos mutantes para a tetraciclina e a canamicina foi significantemente maior que a das linhagens S e R<sup>+</sup> (Tabela 1), fato não observado em relação aos mutantes resistentes à estreptomicina, ao cloranfenicol, à sulfa-

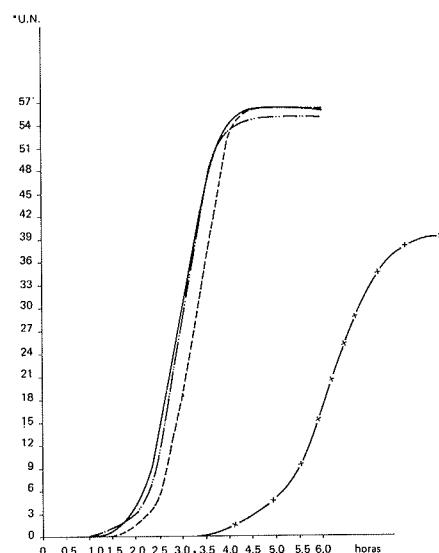
**Tabela 3** — Teste de Tukey relativo à "lag"-fase e taxa de crescimento, em meio complexo da linhagem sensível, da portadora de fator R e de mutantes resistentes às diferentes drogas

Contrastes entre médias	Significância	
Selvagem x mutante E	"Lag"-fase (h)	R (G/h)
Selvagem x mutante T	N.S.	N.S.
Selvagem x mutante C	*	*
Selvagem x mutante K	*	*
Selvagem x mutante An	N.S.	N.S.
Selvagem x mutante Su	N.S.	N.S.
Fator R x mutante E	N.S.	N.S.
Fator R x mutante T	*	*
Fator R x mutante C	*	N.S.
Fator R x mutante K	*	N.S.
Fator R x mutante An	N.S.	N.S.
Fator R x mutante Su	N.S.	N.S.

N.S. = não significante

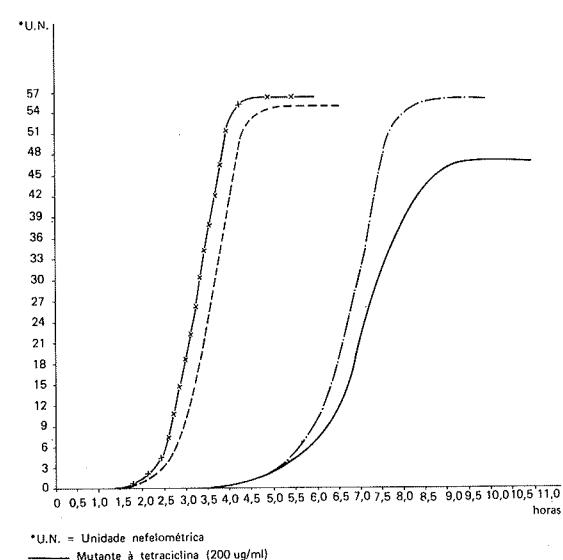
\* = significante ao nível de 5%

**Figura 3** — Curvas de crescimento de *Escherichia coli* sensível, portadora de fator R e mutantes à sulfadiazina e à tetraciclina, em meio complexo



\*U.N. = Unidade nefelométrica  
 — Linhagem sensível  
 - - - Linhagem portadora de Fator R  
 - - - Mutante à sulfadiazina (1000 µg/ml)  
 x-x-x Mutante à tetraciclina (200 µg/ml)

**Figura 4** — Curvas de crescimento de *Escherichia coli* resistentes à tetraciclina, à canamicina, ao ácido nalidíxico e à sulfadiazina, em meio complexo



\*U.N. = Unidade nefelométrica  
 — Mutante à tetraciclina (200 µg/ml)  
 - - - Mutante à kanamicina (100 µg/ml)  
 - - - Mutante ao ácido nalidíxico (500 µg/ml)  
 x-x-x Mutante à sulfadiazina (1000 µg/ml)

**Tabela 4** — Valores encontrados para "lag"-fase e taxa de crescimento, em meio mínimo, de mutantes com diferentes níveis de resistência ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) às drogas

Drogas	E		T		C		K		An		Su	
	Nível $\mu\text{g}/\text{ml}$	"Lag"-fase	R	"Lag"-fase								
50	3,00	0,92	7,00	0,71	3,00	0,98	4,00	0,92	2,00	0,96	3,00	0,97
100	—	—	8,50	0,69	—	—	—	—	—	—	—	—
200	5,00	0,62	6,50	0,43	4,50	0,81	8,00	0,72	3,50	0,78	5,00	0,99
300	—	—	9,00	0,56	—	—	7,50	1,00	—	—	—	—
400	—	—	—	—	5,00	0,69	—	—	—	—	—	—
500	4,50	0,49	—	—	—	—	—	—	2,00	0,86	2,00	0,84
1000	4,50	0,53	—	—	—	—	3,00	0,98	3,00	0,85	2,50	0,98
$\bar{x}$	4,25	0,64	7,75	0,60	4,16	0,83	5,62	0,90	2,62	0,86	3,12	0,94
s	0,86	0,19	1,19	0,12	1,04	0,14	2,49	0,12	0,75	0,07	1,31	0,06

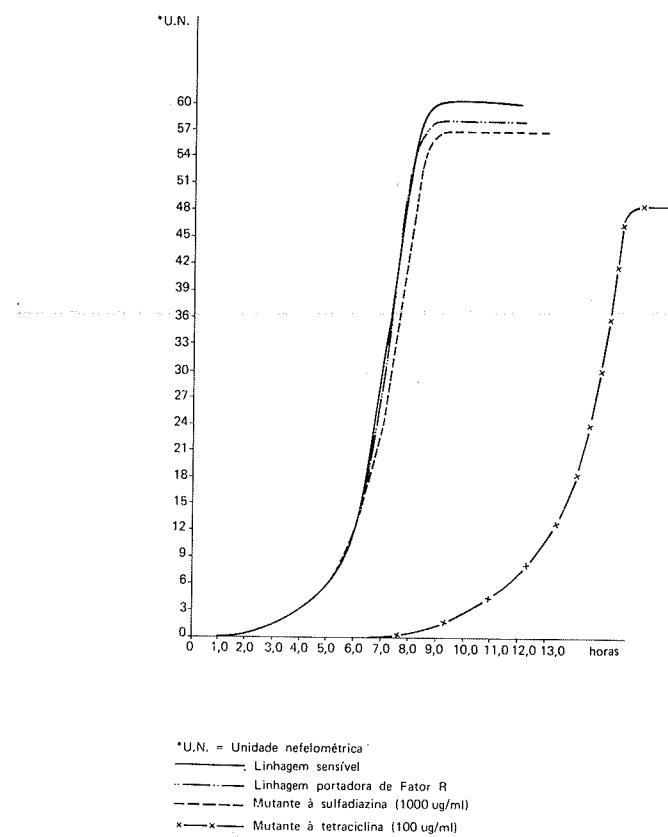
**Tabela 5** — Teste de Tukey relativo à "lag"-fase e taxa de crescimento, em meio mínimo, da linhagem sensível, da portadora de fator R e de mutantes resistentes às diferentes drogas

Contrastes entre médias		Significância	
		"Lag"-fase (h)	R (G/h)
Selvagem x mutante E		N.S.	*
Selvagem x mutante T		*	*
Selvagem x mutante C		N.S.	N.S.
Selvagem x mutante K		*	N.S.
Selvagem x mutante An		N.S.	N.S.
Selvagem x mutante Su		N.S.	N.S.
Fator R x mutante E		N.S.	*
Fator R x mutante T		*	*
Fator R x mutante C		N.S.	N.S.
Fator R x mutante K		*	N.S.
Fator R x mutante An		N.S.	N.S.
Fator R x mutante Su		N.S.	N.S.

diazina e ao ácido nalidíxico. No tocante à capacidade de multiplicação, apenas os mutantes para a estreptomicina e tetraciclina apresentaram taxa de crescimento significantemente inferior à das linhagens S e R<sup>+</sup>, sendo a diferença para os demais mutantes não significante.

A análise das curvas de crescimento dos mutantes à tetraciclina e à sulfadiazina, quando comparadas com as linhagens S e R<sup>+</sup> (Fig. 5) revela que, em ambos os mutantes, são semelhantes às encontradas para o meio complexo. As diferenças quanto à "lag"-fase e fase exponencial das curvas de crescimento dos mutantes à tetraciclina, à estreptomicina, ao

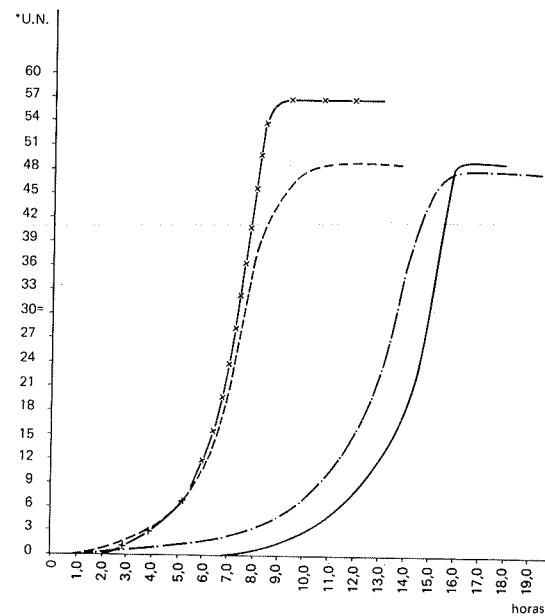
**Figura 5** — Curvas de crescimento de *Escherichia coli* sensível, portadora de fator R e mutantes à sulfadiazina e à tetraciclina, em meio mínimo



\*U.N. = Unidade nefelométrica

- Linhagem sensível
- - - Linhagem portadora de Fator R
- · - - Mutante à sulfadiazina (1000 ug/ml)
- x-x Mutante à tetraciclina (100 ug/ml)

**Figura 6** — Curvas de crescimento de *Escherichia coli* resistentes à tetraciclina, à estreptomicina, ao ácido nalidíxico e à sulfadiazina, em meio mínimo



\*U.N. = Unidade nefelométrica

- Mutante à tetraciclina (100 ug/ml)
- - - Mutante à estreptomicina (1000 ug/ml)
- · - - Mutante ao ácido nalidíxico (500 ug/ml)
- x-x Mutante à sulfadiazina (1000 ug/ml)

ácido nalidíxico e à sulfadiazina estão representadas na Fig. 6.

## Discussão

Verifica-se que, tanto no meio complexo como no meio mínimo, a presença do Fator R na célula, praticamente, não alterou sua capacidade de crescimento. Observa-se, todavia, discreta tendência da linhagem S em crescer mais adequadamente do que a linhagem R<sup>+</sup>, quer se considere a duração média das "lag"-fases, quer se leve em conta o número médio de gerações por hora e a curva de crescimento, embora as diferenças não sejam estatisticamente significantes. Watanabe & Watanabe (23) mencionaram que os fatores R podem reduzir o crescimento das linhagens de *Salmonella* de maneira nem sempre evidente. Romeo (13), estudando a influência de vários fatores R no crescimento de amostras de *Escherichia coli* K12, verificou que alguns reduziram, de maneira discreta, seu crescimento, sendo a

redução mais acentuada quando dois fatores R associados eram desreprimidos. Tomando-se, assim, os resultados do presente trabalho e os encontrados na literatura, admite-se que as células portadoras de fator R reduzem discretamente a sua capacidade de crescimento. Isto poderia ser explicado pelo gasto de energia necessário à síntese do fator.

Com relação à influência das mutações, os resultados foram mais conclusivos para ambos os meios, quer se considere a "lag"-fase, quer se leve em conta a taxa de crescimento. Relativamente ao meio complexo, a duração média das "lag"-fases dos mutantes foi mais longa do que a "lag"-fase da linhagem sensível e da portadora de fator R, sendo a diferença estatisticamente significante para os mutantes resistentes à tetraciclina, ao cloranfenicol e a canamicina. Em se tratando da taxa de crescimento, verifica-se que os mutantes para estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e canamicina apresentaram valores médios inferiores aos das linhagens S e R<sup>+</sup>, embora ocorresse significância apenas à tetraciclina e à canami-

cina. Por outro lado, os mutantes resistentes à sulfadiazina e ao ácido nalidíxico suplantaram, em taxa de crescimento, as amostras S e R<sup>+</sup>.

Os resultados obtidos para o meio mínimo são semelhantes aos obtidos no meio complexo, com exceção da taxa de crescimento dos mutantes à canamicina, que foi praticamente igual à taxa de crescimento da linhagem sensível e à da portadora do fator R. Nota-se ainda que a duração média das "lag"-fases dos mutantes à tetraciclina, canamicina, estreptomicina e cloranfenicol foram duas ou mais vezes superiores à duração média da amostra sensível e da portadora de fator R, o que não ocorreu no meio complexo. De modo geral, o meio mínimo não favoreceu as atividades metabólicas dos mutantes durante a fase inicial de crescimento.

A julgar por estes resultados, parece fora de dúvida que as mutações para resistência a drogas prejudicam o crescimento bacteriano. Tal prejuízo está mais relacionado com a "lag"-fase do que com a taxa de crescimento. Entretanto, é digna de nota a diferença de comportamento quando se compararam as curvas de crescimento dos mutantes para tetraciclina, cloranfenicol e canamicina, com as curvas de crescimento dos mutantes para estreptomicina, ácido nalidíxico e sulfadiazina, particularmente com os dois últimos. Sem dúvida, o efeito das mutações é bem mais evidente no crescimento dos primeiros. Semelhante achado apresenta estreita relação com o fato de que foram necessárias numerosas passagens em placas gradientes para a obtenção dos mutantes à tetraciclina, ao cloranfenicol e à canamicina e relativamente poucas para a obtenção dos mutantes à estreptomicina, à sulfadiazina e ao ácido nalidíxico. Além disso, foi demonstrado que uma única mutação determina níveis elevados de resistência à estreptomicina (4, 17) e à sulfadiazina (12). Quanto ao ácido nalidíxico, os resultados desta pesquisa levam a crer que a mutação para esta droga seja também decorrente de um único passo mutacional, em virtude da facilidade em obter mutantes a elevados níveis de resistência. É possível que os mutantes para estreptomicina, sulfadiazina e ácido nalidíxico sejam consequência de uma ou duas

mutações e os mutantes para tetraciclina, cloranfenicol e canamicina consequência de muitas.

Os resultados do presente trabalho são compatíveis com os obtidos por outros autores (1, 2, 6, 17), pelo menos com relação aos tipos de mutantes investigados em comum.

As informações obtidas podem ainda explicar alguns achados sobre a ocorrência de determinados tipos de enterobactérias resistentes a drogas, encontradas em condições naturais. Toledo & col. (20), pesquisando fatores R em amostras de *Shigella*, verificaram que a resistência a três ou mais drogas era quase sempre decorrente da presença de fatores R, enquanto que a resistência à sulfadiazina e à estreptomicina, bem como a resistência simultânea às duas drogas podia ser determinada por fatores R ou por mutação. Sabe-se, por outro lado, que os fatores R não determinam resistência ao ácido nalidíxico (19), sendo relativamente freqüente o encontro de mutante a essa droga. Além disso, é extremamente raro encontrar-se resistência por mutação à tetraciclina, ao cloranfenicol e à canamicina, em enterobactérias, sendo ainda verificação comum que a resistência múltipla é, na maioria das vezes, mediada por fatores R (3, 8, 9, 14, 20). É possível que a escassez de mutantes resistentes à tetraciclina, ao cloranfenicol e à canamicina, bem como de mutantes com resistência múltipla, possa ser explicada pela dificuldade que encontrariam em se perpetuar na natureza, onde as condições de crescimento não são favoráveis. Esta hipótese estaria de acordo com o fato de serem isoladas, com maior freqüência, mutantes resistentes à sulfadiazina, à estreptomicina e ao ácido nalidíxico, exatamente os mutantes cuja capacidade de crescimento não é substancialmente alterada pelo evento mutacional. A mesma linha de raciocínio pode ser aplicada ao encontro, extremamente comum, de enterobactérias portadoras de fator R, em condições naturais.

#### Agradecimento

Ao Prof. Dr. Luiz Rachid Trabulsi, o reconhecimento e a gratidão da autora pela orientação do presente trabalho.

## Referências Bibliográficas

1. Blackwell Jr., J.T. & McVeigh, I. — Growth of streptomycin-susceptible and streptomycin-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antibiotics Chemother.*, 10:495-502, 1960.
2. Couturier, N.; Desmet, L. & Thomas, R. — High pleiotropy of streptomycin mutations in *Escherichia coli*. *Biochem. biophys. Res. Comun.*, 16:244-248, 1964.
3. Datta, N. — Infectious drug resistance. *Brit. med. Bull.*, 21:254-259, 1965.
4. Eagle, H.; Fleischman, R. & Levy, M. — Development of increased bacterial resistance to antibiotics. I — Continuous spectrum of resistance to penicillin, chloramphenicol, and streptomycin. *J. Bacteriol.*, 63:623-638, 1952.
5. English, A.R. & McCoy, E. — Growth comparisons of streptomycin-sensitive and streptomycin-resistant *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*. *J. Bacteriol.*, 62:19-26, 1951.
6. Lopez-Revilla, R. & Bastarrachea, F. — A slow-growing, streptomycin resistant mutant of *Escherichia coli* affected in protein synthesis and ribosomal assembly. *Mol. Gen. Genet.*, 113:99-113, 1971.
7. Mitsuhashi, S.; Harada, K. & Hashimoto, H. — Multiple resistance of enteric bacteria and transmission of drug resistance to other strains by mixed cultivation. *Japan J. exp. Med.*, 30:176-181, 1960.
8. Mitsuhashi, S.; Hashimoto, H.; Egawa, R.; Tanaka, T. & Nagai, Y. — Drug resistance of enteric bacteria. IX — Distribution of R factors in gram negative bacteria from clinical sources. *J. Bacteriol.*, 93:1242-1245, 1967.
9. Moreno, G. — Resistência infecciosa a drogas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de animais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32:47-55, 1973.
10. Porto, E. & Regueiro, B. — Caracteres diferenciales entre raza sensibles y resistentes a la bencil-penicilina, del *Staphylococcus aureus*. *Microbiología esp.*, 15:101-124, 1962.
11. Ramsey, H.H. — The growth of sensitive and resistant strains of *Micrococcus pyogenes* in the presence of varying concentrations of chloramphenicol. *Antibiotics Chemother.*, 8:250-254, 1958.
12. Richmond, M.H. — Extrachromosomal elements and the spread of antibiotic resistance in bacteria. *Biochem. J.*, 113:225-234, 1969.
13. Romero, E. — Studio della crescita batterica in presenza di fattori R: contributo alla conoscenza delle relazioni interplasmidiche in un fattore R "complesso" di origine naturale. *Boll. Inst. sieroter. milan.*, 47:504-514, 1968.
14. Schnitzer, R.J. — Bacterial drug resistance: current perspectives. *J. Mt Sinai Hosp.*, 34:489-495, 1967.
15. Schnitzer, R.J. — Drug resistance in chemotherapy. In: *Experimental Chemotherapy*. New York, Academic Press, V. 1, p. 81-128, 1963.
16. Schnitzer, R.J. & Grumberg, E. — Drug resistance of bacteria. In: *Drug resistance of microorganisms*. New York, Academic Press, p. 87-191, 1957.
17. Sompolinsky, D. & Samra, Z. — Mechanism of high-level resistance to chloramphenicol in different *Escherichia coli* variants. *J. gen. Microbiol.*, 50:56-66, 1968.
18. Szybalski, W. & Bryson, V. — Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. *J. Bacteriol.*, 64:489-499, 1952.
19. Thomas, M.E. & Datta, N. — Emergence of *Shigella sonnei* resistant to kanamycin and to nalidixic acid, without exposure to these drugs. *J. Med. Microbiol.*, 2:457-461, 1969.
20. Toledo, M.R.F.; Zuliani, M.E. & Trabulsi, L.R. — Single and transferable resistance among clinically isolated *Shigella* strains. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 1:1-11, 1970.
21. Trabulsi, L.R. & Ewing, W.H. — Sodium acetate medium for the differentiation of *Shigella* and *Escherichia* cultures. *Publ. Hlth Lab.*, 20:137-140, 1962.
22. Trabulsi, L.R. & Zuliani, M.E. — Estudos sobre *E. coli* 0111:B4. III — Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e a seis antibióticos. *Rev. Inst. Med. trop.*, 11:323-334, 1969.
23. Watanabe, T. & Watanabe, M. — Episomic resistance factors in *Enterobacteriaceae*. 39. Growth rates of *Salmonella typhimurium* LT — 2 carrying various R-factors. *Tokyo, Med. Biol.*, 79:143-145, 1969.

**Isolation and identification  
of menaquinone from  
*Corynebacterium ovis*  
(*C. pseudotuberculosis*)\***

Thuioshi Ioneda  
& Célio Lopes Silva

**Summary**

A menaquinone was isolated from lipids of *Corynebacterium ovis*. Its isolation was carried out by column chromatography and by preparative thin-layer chromatography. The purified fraction was analysed by ultraviolet, infrared, nuclear magnetic resonance and mass spectroscopies. It contained a substance identified as menaquinone MK8 (II-H), similar to quinones described in *Corynebacterium diphtheriae*, *Nocardia rhodochrous* and *Mycobacterium phlei*.

**Resumo**

*Isolamento e identificação de menaquinona de Corynebacterium ovis (C. pseudotuberculosis)*

A menaquinona foi isolada a partir de lipídeos de *Corynebacterium ovis*. O seu isolamento foi realizado por cromatografias em coluna e em camada delgada. A fração purificada foi analisada por espectroscopias no infravermelho, ultravioleta, ressonância magnética nuclear e por espectrometria de massa. Ela continha uma substância identificada como menaquinona MK8 (II-H), semelhante às quinonas descritas em *Corynebacterium diphtheriae*, em *Nocardia rhodochrous* e em *Mycobacterium phlei*.

**Introduction**

It was shown that *Corynebacterium diphtheriae* contains a menaquinone (2-methyl-1,4-naphthoquinone) with the isoprenoid side chain attached to the 3-position of naphthoquinone nucleus (3), further identified as dihydromenaquinone MK8 (II-H) (dihydro 2-methyl-3-octaprenyl-1,4-naphthoquinone) (9). In this substance, the dihydroisoprene unit of the polyprenoid side chain was located at the second unit from the quinone ring (2). Similarly, the dihydroisoprene unit of the side chain of the dihydro 2-methyl-3-nonaprenyl-1,4-naphthoquinone, MK9 (II-H) from *Mycobacterium phlei* was located at the second unit from the quinone ring (1).

Involvements of menaquinones in electron

transport system in *C. diphtheriae* (8) and in oxidative phosphorylation in *Mycobacterium phlei* (4) have been described. Since these biological functions attributed to menaquinones are of paramount importance for cells of these organisms, it was reasonable to suppose that *Corynebacterium ovis* (*C. pseudotuberculosis*), a pathogen organism for sheep, also contained a similar type of quinones.

This communication describes the isolation of a dihydromenaquinone MK8 (II-H) from lipids of *C. ovis*.

**Material and Methods**

**Chemicals** — All chemicals were of analytical grade and solvents were distilled prior to use.

\* Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Project Bioq/FAPESP)  
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 20780, 01000 São Paulo SP

**Chromatographic procedures** — Column chromatography was carried out on silicic acid (Carlo Erba, Milano, Italy) and on aluminium oxide (E. Merck A.G., Darmstadt, Germany). These adsorbents were treated as described previously (11). Thin layer chromatography was carried out on silica gel H plates (E. Merck A.G., Darmstadt, Germany). The following developing solvents were used: n-hexane-ethyl ether-acetic acid (70:5:1, v/v/v) (solvent A); n-hexane-ethyl ether-acetone-acetic acid (70:20:5:1, v/v/v/v) (solvent B). Detection was carried out by exposing the plates to iodine vapours.

**Organism** — *Corynebacterium ovis* (*C. pseudotuberculosis*), a sub-clone of the strain B 1/50, was the generous gift of Prof. H.R. Carne, Department of Pathology, University of Cambridge, Cambridge, England. The cells were grown for one week at 37°C in two liter Erlenmeyer flasks containing 250 ml of a medium of the following composition: 1.5% glycerol, 1% yeast extract and 0.1% sodium chloride.

**Extraction and fractionation of lipids** — The cells were collected by filtration through sintered glass filter and washed with distilled water. The cell residue was scraped into an Erlenmeyer flask and extracted with three volumes of ethanol-ethyl ether (1:1, v/v) by stirring for thirty minutes. The suspension was filtered and the residue re-extracted six times with the same solvent. All filtrates were pooled and concentrated on a rotary evaporator. The residue was extracted with ethyl ether and the fraction washed three times with 1 M sodium chloride, dried over anhydrous sodium sulphate, filtered and concentrated. The material was redissolved in ethyl ether, then three volumes of acetone were added. The precipitate (acetone-insoluble lipids) was collected by centrifugation and the supernatant was brought to dryness (acetone-soluble lipids).

**Isolation of menaquinone** — The acetone-soluble lipids (2.7g) were dissolved in chloroform and loaded on a column of silicic acid (3 x 38cm); this column was eluted with 680ml of chloroform. The solution was concentrated and the yellowish solid residue (112mg) was fractionated by preparative thin-layer chromatography in solvent A. The yellowish band was scraped off and layered on a column of silicic acid (1 x 10cm), previously washed with n-

hexane-benzene (3:1, v/v). This column was eluted with 100ml of n-hexane-benzene (3:1, v/v) and the material (15.3mg) was purified on a column of aluminium oxide (0.5 x 5cm), previously washed with 15ml of n-hexane-benzene (3:1, v/v). The residue (14mg) eluted with n-hexane-benzene (3:1, v/v) was loaded again on a column of aluminium oxide under the same conditions. Finally, a yellowish liquid was obtained.

**Physical methods** — Infrared spectrum was recorded as solvent-free film on a Perkin Elmer infrared grating spectrophotometer, model 337. Ultraviolet spectrum was recorded on a Beckman BK2 recording spectrophotometer in n-hexane, Uvasol Grade (20 µg/ml). Nuclear magnetic resonance spectrum was recorded at 60 MHz on a Varian T-60 spectrometer. The fraction isolated was dissolved in carbon tetrachloride containing 1% tetramethylsilane as internal standard (12mg/ml). Mass spectrum was recorded in a Hitachi RMU-7MG mass spectrometer at 70 eV and at pressure of  $5.0 \times 10^{-7}$  torr.

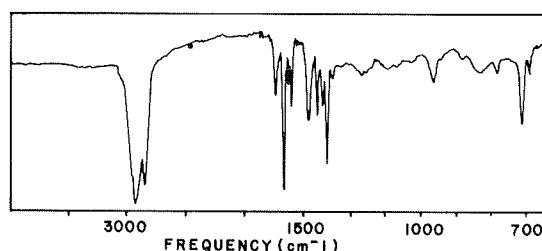
The sample was vaporized at the ion source with a heated direct inlet system operating at 160°C.

## Results

The yellowish and viscous liquid isolated from *Corynebacterium ovis* showed on thin-layer chromatography Rf values of 0.5 and 0.83 in solvents A and B, respectively.

The ultraviolet spectrum of the fraction showed maxima at 243, 249, 260 and 269nm. The infrared spectrum (Fig. 1) showed a pattern similar to those of menaquinones from *Mycobacterium phlei* (7) and *Halobacterium cutirubrum* (12). According to interpretations given to those menaquinones, and quoted in (7) and (12),

**Figure 1** — Infrared spectrum of the fraction isolated from *Corynebacterium ovis* (*C. pseudotuberculosis*) recorded as solvent-free film in a Perkin Elmer grating infrared spectrophotometer model 337



the bands on the spectrum of *C. ovis* were assigned as follows: those in the region of  $2900\text{cm}^{-1}$  were associated with C-H stretching of  $\text{CH}_3$  and  $\text{CH}_2$  groups; the absorptions for C-CH<sub>2</sub> and C-CH<sub>3</sub> were observed at  $1445\text{cm}^{-1}$  and  $1379\text{cm}^{-1}$ , respectively. The bands at  $1660\text{cm}^{-1}$  and at  $1620\text{cm}^{-1}$  were assigned for C=O stretching and for C=C stretching of the quinone ring, respectively.

The vibrations of a conjugated aromatic ring were represented by a band at  $1600\text{cm}^{-1}$ , and the peak at  $720\text{cm}^{-1}$  was due to C-H out-of-plane deformation of adjacent ring hydrogen atoms in the naphthoquinone nucleus. The broad band with a maximum at  $838\text{cm}^{-1}$ , a weak shoulder at  $812\text{cm}^{-1}$  and a small band at  $888\text{cm}^{-1}$ , suggested as representative bands of the polyprenoid chain (7), were also observed

in the spectrum of *C. ovis*. A sharp and of medium intensity band corresponding to ketone group was observed at  $1740\text{cm}^{-1}$ .

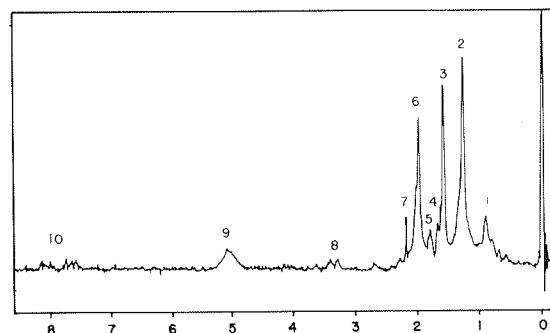
The nuclear magnetic resonance spectrum (Fig. 2) also showed signals which were similar to those of menaquinones described in *Mycobacterium phlei* (7) and in *Halobacterium cutirubrum* (12). Therefore, the signal on the spectrum of *C. ovis* were assigned as follows: at  $\delta 0.85\text{ppm}$  (peak 1: methyl group of the dihydroisoprene unit); at  $\delta 1.3\text{ppm}$  (peak 2: methylene group of the dihydroisoprene unit); at  $\delta 1.5\text{ppm}$  (peak 3: internal or end of the chain trans methyl group); at  $\delta 1.65\text{ppm}$  (peak 4: cis methyl group); at  $\delta 1.75\text{ppm}$  (peak 5: trans methyl group on the isoprene unit next to the quinone ring); at  $\delta 2.0\text{ppm}$  (peak 6: side chain methylenes of the isoprene units); at  $\delta 2.2\text{ppm}$  (peak 7: methyl group of the quinone ring); at  $\delta 3.4\text{ppm}$  (peak 8: methylene group next to the quinone ring); at  $\delta 5.2\text{ppm}$  (peak 9: protons of the isoprene units) and at  $\delta 7.7\text{ppm}$  and  $\delta 8.2\text{ppm}$  (peak 10: aromatic hydrogens).

The mass spectrum (Fig. 3) showed a peak at m/e 718 of the molecular ion ( $\text{M}^+$ ) and a base peak at m/e 225. Small peaks appeared at m/e 649, 445 and 187. Other series of peaks at m/e 399, 331, 263 and 195 were observed.

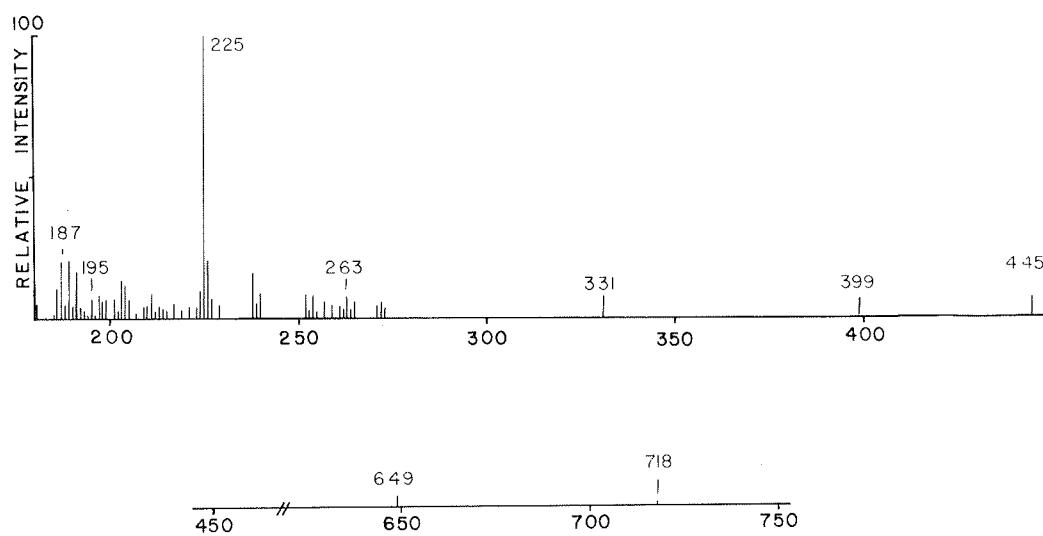
## Discussion

The pattern of the ultraviolet spectrum of the fraction isolated from *Corynebacterium ovis* was characteristic of 1,4-disubstituted naph-

**Figure 2** — Nuclear magnetic resonance spectrum of the fraction isolated from *Corynebacterium ovis* (*C. pseudotuberculosis*), recorded on a Varian T-60, in carbon tetrachloride containing 1% of tetramethylsilane.



**Figure 3** — Mass spectrum of the fraction isolated from *Corynebacterium ovis* (*C. pseudotuberculosis*) recorded on a Hitachi RMU-7 MG mass spectrometer



thoquinone (7, 12). The absorption bands in the infrared spectrum suggested the occurrence of quinone and aromatic rings and of the isoprenoid side chain, therefore indicating a structure of naphthoquinones (7, 12). However, a peak at  $1740\text{cm}^{-1}$  of the carbonyl group present in the spectrum was probably due to a contaminant. A similar band has been described in the menaquinone fraction of *Halobacterium cutirubrum* (12). The peaks observed on the nuclear magnetic resonance spectrum showed a pattern typical of the menaquinone, except concerning the intensity of the peak at  $\delta 1.3\text{ppm}$  (peak 2), which is not explained by the methylene group of the dihydroisoprene unit. The intensity of this peak may be due to other methylene groups of the saturated hydrocarbon chain.

The peak at m/e 718 in the mass spectrum indicated that the naphtoquinone had one dihydroisoprene unit in the octaprenoid side chain.

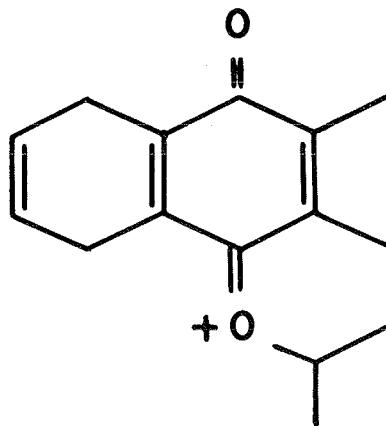
The base peak at m/e 225 has been attributed to the disubstituted 1,4-naphthoquinone with a double bond in the first isoprene unit of the side chain, therefore corresponding to structure 1 (5).

On the other hand, the peak at m/e 187, according to that observed in the spectrum of menaquinones containing tetrahydrogenated iso-

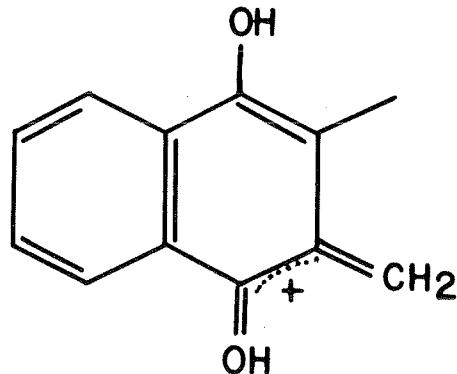
prenoid side chain (13), was assigned to the fragment ion shown in structure 2. This peak has been correlated to a rupture between the  $\alpha$ - and  $\beta$ -carbon atoms of the first isoprene unit from the quinone ring (13). The series of peaks at m/e 195, 263, 331 and 399 (differing each other by 68 units of isoprenes), not correlated to the fragmentation of menaquinone, were assigned to contaminants.

Although peaks corresponding to losses of two and three isoprene units from the terminal isoprene unit of the polyprenoid side chain were not seen in the spectrum, the peak observed at m/e 445 indicated a loss of four-isoprene units from the methyl terminal of the octaprenoid side chain. A similar peak has been described in the mass spectrum of dihydro-2-methyl-3-octaprenyl-1,4-naphthoquinone, MK8 (IIH) of *Mycobacterium phlei* (6).

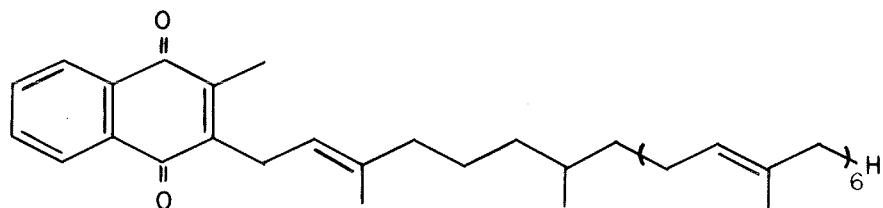
Therefore, it was assumed that the menaquinone of *Corynebacterium ovis* might also be a dihydro-2-methyl-3-octaprenyl-1,4-naphthoquinone, MK8 (IIH), which carries all trans double bonds in the polyprenoid side chain, represented by structure 3. This structure is similar to those of menaquinones described in *C. diphtheriae* (2, 3), *Nocardia rhodochrous* (10) and *Mycobacterium phlei* (6).



Structure 1



Structure 2



Structure 3

## Acknowledgments

The mass spectrum was recorded by Dr. K. Mizuta at Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), São Paulo, with kind collaboration of Dr. T. Morita. We wish to express our thanks to

Mrs. L.Y. Ioneda and to Mr. A. dos Santos for technical assistance, and to Dr. F.G. Nóbrega for reading the manuscript.

## References

1. Azerard, R.; Cyrot, M.O. & Lederer, E. — Structure of the dihydromenaquinone-9 of *Mycobacterium phlei*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 27:249-252, 1967.
2. Beau, S., Azerard, R. & Lederer, E. — Isolément et caractérisation des dihydro-menaquinones des myco- et corynebactéries. Bull Soc. Chim. Biol., 48:569-581, 1966.
3. Bishop, D.H.L.; Pandya, K.P. & King, H.K. — Ubiquinone and vitamin K in bacteria. Biochem. J. 83:606-614, 1962.
4. Brodie, A.F. & Ballantine, J. — Oxidative phosphorylation in fractionated bacterial systems. II. The role of vitamin K. J. Biol. Chem. 235:226-231, 1960.
5. Budzikiewics, H.; Djerasi, C. & Williams, D.H. — Mass spectrometry of organic compounds. San Francisco, Holden-Day, Inc. p. 527-538, 1960.
6. Campbell, I.M. & Bentley, R. — Inhomogeneity of vitamin K<sub>2</sub> in *Mycobacterium phlei*. Biochemistry, 7:3323-3327, 1968.
7. Dunphy, P.J.; Gutnick, D.L., Phillips, P.G. & Brodie, A.F. — A new natural naphthoquinone in *Mycobacterium phlei*. Cis-dihydromenaquinone-9, struture and function. J. Biol. Chem., 243:398-407, 1968.
8. Krogstad, D. J. & Howland, J.L. — Role of menaquinone in *Corynebacterium diphtheriae* electron transport. Biochim. Biophys. Acta, 118:189-191, 1966.
9. Scholes, P.B. & King, H.K. — Isolation of a naphthoquinone with partly hydrogenated side chain from *Corynebacterium diphtheriae*. Biochem. J., 97:766-768, 1965.
10. Silva, C.L. & Ioneda, T. — Menaquinone from *Nocardia rhodochrous*. The Biology of Actinomycetes and Related Organisms, 12:39-41, 1977.
11. Silva, C.L. & Ioneda, T. — Isolation and identification of menaquinone and acylglycerols in the acetone-soluble lipids from *Nocardia rhodochrous*. Rev. Microbiol., 8:39-42, 1977.
12. Tornabene, T.G.; Kates, M.; Gelpi, E. & Oro, J. — Occurrence of squalene, di- and tetrahydrosqualenes, and vitamin MK8 in an extremely halophilic bacterium, *Haloferax cutirubrum*. J. Lip. Res. 10:294-303, 1968.
13. Yamada, Y.; Inouye, G.; Tahara, Y. & Kondo, K. — On the chemical structure of menaquinones with the tetrahydrogenated isoprenoid side chain. Biochim. Biophys. Acta, 486:195-203, 1977.

## Influência da multirresistência a drogas sobre o crescimento de *Escherichia coli*

Darcy Satsuki Aoki Watanabe\*

### Resumo

Curvas de crescimento de linhagens de *E. coli*, respectivamente sensível e resistentes a uma, duas e três drogas antibacterianas, revelam que a multirresistência compromete a "lag"-fase e a própria taxa de crescimento dos mutantes resistentes, pela seguinte ordem: o mutante triplo é mais afetado do que o duplo e, este, mais do que o simples. O fenômeno é estatisticamente comprovado, tanto para os microrganismos cultivados em meio complexo (BHI) como em meio mínimo.

### Summary

*Influence of multiple-drug resistance on the growth of Escherichia coli*

Growth curves determined in complex and minimal media reveal that mutations for multiple-drug resistance in *E. coli* interfere on both lag-phase and growth rate, by the following order: triple mutation is more compromising than double and this more than single, when compared to the original, non-resistant strain. The phenomenon is statistically ascertained.

### Introdução

Praticamente todas as espécies bacterianas apresentam linhagens resistentes aos mais diversos antibióticos (5, 6, 14, 15, 17, 19). Ainda que os mecanismos genéticos tenham sido exaustivamente estudados (4, 14, 18), pouco se conhece sobre as consequências que a resistência a drogas possa trazer para a sobrevivência das bactérias.

A comparação entre a capacidade de crescimento de *E. coli* resistente à estreptomicina e a linhagem original revela que a taxa de crescimento dos mutantes é inferior à da linhagem selvagem (1, 2, 8).

Resistência múltipla, por mutação, é fenômeno relativamente raro, mas é possível encontrar amostras resistentes a dois ou mais antibióticos, "in vitro" e "in vivo" (7, 13). Linhagem de *E. coli* resistente ao cloranfenicol revelou, por técnica de seleção, linhagem com considerável grau de resistência à aureomicina e à puromicina (12).

A influência de mutações sobre o crescimento de bactérias com resistência simples, dupla e tripla, a diferentes drogas, foi estudada através de curvas de crescimento de *E. coli* sensível e dos descendentes resistentes, em meios complexo e mínimo.

### Material e Métodos

A partir da linhagem de *Escherichia coli* 0111: B4:H2, resistente a 1 $\mu$ g/ml de estreptomicina (E), tetraciclina (T), cloranfenicol (C), canamicina (K), ácido nalidíxico (An) e a 20 $\mu$ g/ml de sulfadiazina (Su), foram obtidos descendentes resistentes a uma, duas e três drogas, utilizando-se a técnica de Szybalski & Bryson (19). Em seguida, verificou-se a capacidade de crescimento da linhagem sensível e dos mutantes simples, duplos e triplos, em meio complexo "Brain Heart Infusion-Oxoid" (BHI) e em meio mínimo (fosfato monoácido de sódio, 105g; fosfato diácido de sódio, 45g; citrato de

\* Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola do Campus de Botucatu. Caixa Postal 102, 18610 RUBIÃO JÚNIOR SP.

sódio, 4,7g; sulfato de magnésio anidro, 0,5g; sulfato de amônio, 10g; glicose, 2g e água destilada, 1000ml), segundo Watanabe (21). Para tanto, foram selecionadas linhagens resistentes, especificadas a seguir. A uma droga e equivalentes a: 50, 100, 200, 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para a sulfadiazina, estreptomicina e ácido nalidíxico; 50, 100, 200 e 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para a tetraciclina; 50, 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para o cloranfenicol e 50, 100, 200, 300 e 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para a canamicina. As duas drogas e suas concentrações de: E 1000, Su 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; E 1000, Su 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; E 1000, Su 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; E 1000, C 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; E 1000, C 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; E 1000, K 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; E 1000, K 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; E 1000, An 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; E 1000, An 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Su 1000, E 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Su 1000, E 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Su 1000, E 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . E, as três drogas: uma, E 1000, Su 500 e K 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e outra, E 1000, Su 500 e An 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

## Resultados

Os valores médios, obtidos para a "lag"-fase e taxa de crescimento da linhagem sensível e de mutantes simples, duplos e triplos, em meios complexo e mínimo (Tabela 1), demonstram, para ambos os meios, que: os mutantes triplos exibem maior dificuldade de crescimento que os duplos e, estes, maior que os simples; a amostra sensível sobrepujou, em crescimento, a todos os mutantes.

Para o meio complexo (Tabela 2), a análise estatística revelou significância ao nível de 5% para todas as comparações relativas à fase ini-

**Tabela 1** — Média dos valores encontrados para "lag"-fase e taxa de crescimento (R) de *Escherichia coli* sensível (S) e mutantes simples (MS), duplo (MD) e triplô (MT) em meio complexo (BHI) e em meio mínimo (MM)

		"Lag"-fase (h) $\bar{x} \pm s$	R (G/h) $\bar{x} \pm s$	n
S	BHI	1,72 $\pm$ 0,23	2,95 $\pm$ 0,33	9
	MM	2,18 $\pm$ 0,25	0,97 $\pm$ 0,05	8
MS	BHI	2,56 $\pm$ 0,84	2,61 $\pm$ 0,62	30
	MM	4,60 $\pm$ 2,16	0,80 $\pm$ 0,17	23
MD	BHI	3,31 $\pm$ 0,95	1,91 $\pm$ 0,45	12
	MM	5,70 $\pm$ 3,08	0,66 $\pm$ 0,13	12
MT	BHI	5,00 $\pm$ 0,00	1,80 $\pm$ 0,43	2
	MM	21,00 $\pm$ 14,14	0,74 $\pm$ 0,15	2

R = G/h (número de gerações por hora)

n = número de mutantes ou de experimentos

$\bar{x}$  = média

s = desvio padrão

**Tabela 2** — Contrastos entre as médias das "lag"-fase e taxas de crescimento (R) da amostra sensível e dos mutantes simples, duplo e triplô, observados em meio complexo, pelo teste t bicaudal

Contrastos entre médias	G.L.	Significância
		"Lag"-fase (h) R (G/h)
M. simples x M. duplo	40	*
M. simples x M. duplo	30	*
M. simples x sensível	37	*
M. duplo x M. triplô	12	*
M. duplo x sensível	19	*
M. triplô x sensível	9	*

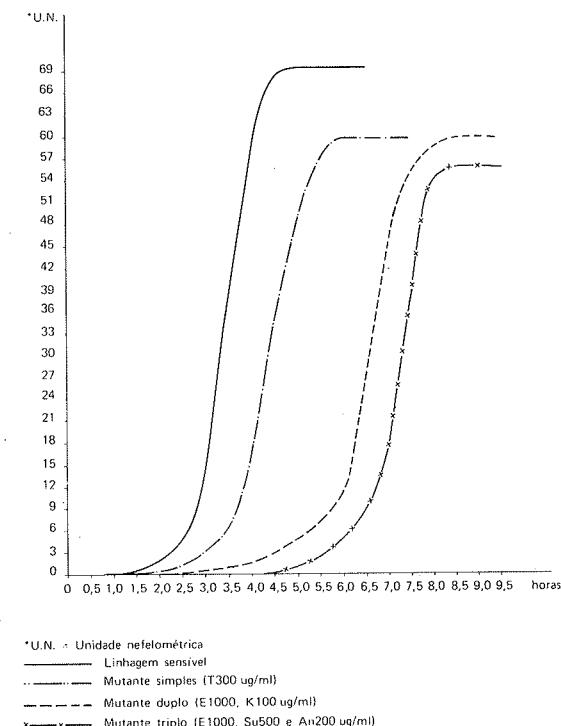
M = mutantes

\* = significância ao nível de 5%

N.S. = não significante

G.L. = graus de liberdade

**Figura 1** — Curvas de crescimento de *Escherichia coli* sensível e de mutantes simples, duplo e triplô, em meio complexo



\*U.N. = Unidade nefelométrica

— Linhagem sensível

- - - Mutante simples (T300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

- · - - Mutante duplo (E1000, K100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

- x - - Mutante triplô (E1000, Su500 e An200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

cial de crescimento. Quanto à capacidade de crescimento, apenas os mutantes duplos não diferiram significantemente dos triplos. As curvas de crescimento são distintas, notadamente as "lag"-fases (Fig. 1).

Com relação ao meio mínimo (Tabela 3), a análise estatística demonstrou diferença significativa entre a linhagem sensível e os mutantes simples e duplos, no sentido destes apresentarem maior dificuldade de crescimento. Para as demais comparações, com exceção da taxa de crescimento entre mutantes simples e duplos,

**Tabela 3** — Contrastes entre as médias das "lag"-fases e taxas de crescimento (R) da amostra sensível e dos mutantes simples, duplo e triplo, observados em meio mínimo, pelo teste t bicaudal

Contrastes entre médias	G.L.	Significância	"Lag"-fase (h)	R (G/h)
M. simples x M. duplo	33	N.S.	*	
M. simples x M. triplo	23	N.S.		N.S.
M. simples x sensível	29	*	*	*
M. duplo x M. triplo	12	N.S.		N.S.
M. duplo x sensível	18	*		*
M. triplo x sensível	8	N.S.		N.S.

não acusaram significância, em virtude dos elevados desvios-padrão apresentados pelos duplos e triplos mutantes. Há nítida diferença quanto à "lag"-fase e velocidade de crescimento entre a amostra original e os mutantes simples, duplo e triplo (Fig. 2).

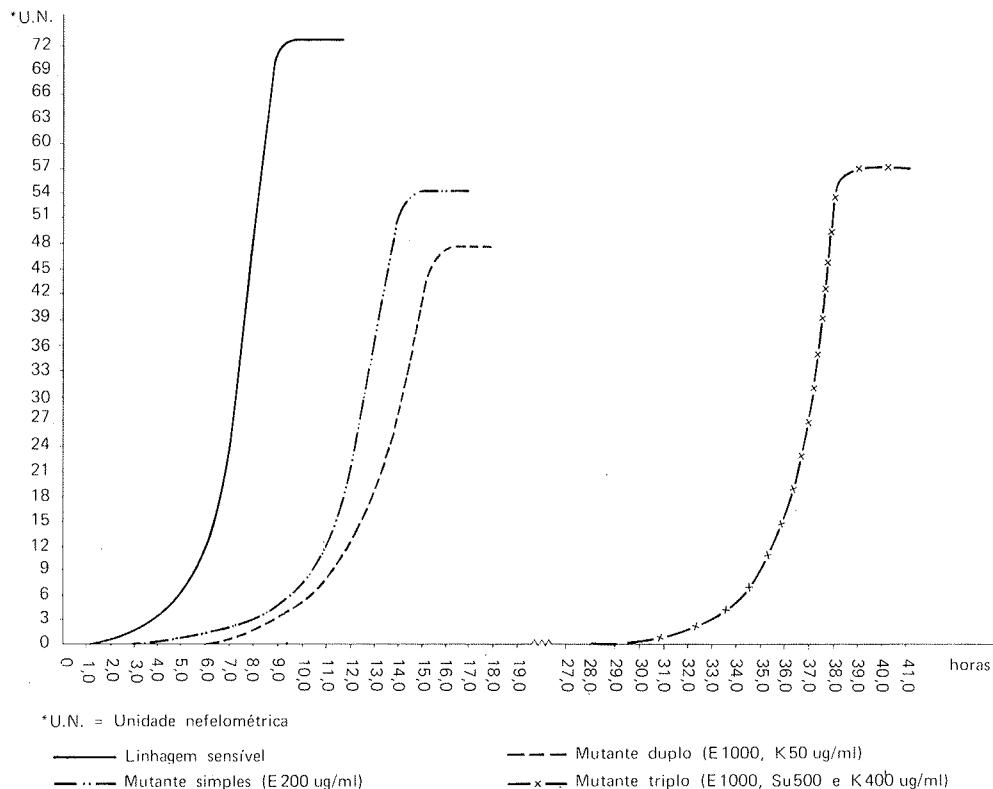
## Discussão

A análise das curvas de crescimento, realizadas tanto no meio complexo como no meio mínimo, demonstra que as mutações para resistência a drogas prejudicam consideravelmente,

o crescimento bacteriano. Isto afeta não só mente a "lag"-fase, como também a taxa de crescimento, uma vez que os mutantes apresentam maiores dificuldades em iniciar o crescimento e continuam a se desenvolver com menor intensidade, quando comparados com a amostra original, sensível.

Para o meio complexo, com exceção da diferença relativa à taxa de crescimento dos mutantes duplo e triplo, todas as demais comparações, inclusive as referentes à "lag"-fase, foram significativas ao nível 5% (Tabela 2). Fenômeno semelhante pôde ser constatado em relação ao meio mínimo, salientando-se todavia, a maior dificuldade dos mutantes em iniciar o crescimento. Os mutantes simples e duplo apresentam alterações no crescimento, tanto na "lag"-fase, como na fase logarítmica, quando comparados com a amostra sensível. Os demais parâmetros de comparação não demonstram significância ao nível de 5%, em virtude dos elevados desvios-padrão relativos à "lag"-fase dos mutantes duplo e triplo. As curvas de crescimento, notadamente das "lag"-fases entre a linhagem sensível e seus descendentes resistentes a uma, duas e três drogas, no meio complexo e no meio mínimo, são diferentes (Fig. 1, 2).

**Figura 2** — Curvas de crescimento de *Escherichia coli* sensível e de mutantes simples, duplo e triplo, em meio mínimo



Os resultados indicam que as mutações para resistência a drogas, de um modo geral, produzem alterações no processo metabólico da célula bacteriana, trazendo, como consequência, mudanças na curva de crescimento, quer se considere o número médio de gerações por hora, quer se leve em conta a duração média das "lag"-fases. Tais resultados encontram subsídio no princípio geral de que a maioria das mutações, originadas de tipos selvagens bem estabelecidos, produz genótipos menos favoráveis (9).

Os experimentos demonstram ainda que quanto maior for o número de marcadores de resistência envolvidos no processo mutacional, maior a dificuldade do microrganismo em iniciar o crescimento. Este fato concorda com a afirmação de Luria (9), no sentido de que mutações sucessivas, acumuladas, em uma única bactéria, afetam a taxa de crescimento, conduzindo, portanto, a crescimento mais lento.

## Referências Bibliográficas

1. Blackwell Jr., J.T. & McVeigh, I. — Growth of streptomycin-susceptible and streptomycin-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antibiotics Chemother.*, 10:495-502, 1960.
2. Couturier, M.; Desmet, L. & Thomas, R. — High pleiotropy of streptomycin mutations in *Escherichia coli*. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 16:244-248, 1964.
3. Datta, N. — Prevalence of extrachromosomal drug resistance. R. factors in *Escherichia coli*. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 182:59-64, 1971.
4. Demerec, M. — Production of *Staphylococcus* strains resistant to various concentrations of penicillin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 32:16-24, 1945.
5. Eagle, H.; Fleischman, R. & Levy, M. — Development of increased bacterial resistance to antibiotics. I — Continuous of resistance to penicillin, chloramphenicol, and streptomycin. *J. Bacteriol.*, 63:623-638, 1952.
6. Emmart, E.W.; McClosky, W.T.; Smith, M.I. & Lieberman, J. E. — Acquired resistance of *M. tuberculosis* to streptomycin vitro and its behavior in experimental infections. *Am. Rev. Tuberc. pulm. Dis.*, 59:438-448, 1949.
7. Fusillo, M.H. — Selection of stable multiple antibiotic resistant variants of *Micrococcus pyogenes* in the absence of antibiotics. *Antibiotics Chemother.*, 6:125-129, 1956.
8. Lopez-Revilla, R. & Bastarrachea, F. — A slow-growing streptomycin resistant mutant of *Escherichia coli* affected in protein synthesis and ribosomal assembly. *Mol. Gen. Genet.*, 113:99-113, 1971.
9. Luria, S.E. — Spontaneous bacterial mutations to resistance to antibacterial agents. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, 11:130-138, 1946.
10. Mitsuhashi, S.; Hashimoto, H.; Egawa, R.; Tanaka, T. & Nagai, Y. — Drug resistance of enteric bacteria. IX — Distribution of R factors in gram negative bacteria from clinical sources. *J. Bacteriol.*, 93:1242-1245, 1967.
11. Moreno, G. — Resistência infecciosa a drogas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de animais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32:47-55, 1973.
12. Reeve, C.R. & Bishop, J.O. — Variations in resistance to three antibiotics among some single-step mutants to chloramphenicol resistance in a strain of *Escherichia coli* K 12. *Genet. Res. Camb.*, 6:310-315, 1965.
13. Schnitzer, R.J. — Bacterial drug resistance: current perspectives. *J. Mt Sinai Hosp.*, 34:489-495, 1967.
14. Schnitzer, R.J. — Drug resistance in chemotherapy. In: *Experimental Chemotherapy*. New York, Academic Press, 1:81-128, 1963.
15. Schnitzer, R.J. & Grumberg, E. — Drug resistance of bacteria. In: *Drug resistance of microorganisms*. New York, Academic Press, p. 87-191, 1957.
16. Smith, W. — The incidence of infective drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from diseased human beings and domestic animals. *J. Hyg., Camb.*, 64:465-474, 1966.
17. Seneca, H. — Bacterial mutation and the evolution of drug resistance in relation to chemotherapy. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 15:611-628, 1967.
18. Sompolinsky, D. & Samra, Z. — Mechanism of high-level resistance to chloramphenicol in different *Escherichia coli* variants. *J. Gen. Microbiol.*, 50:56-66, 1968.
19. Szybalski, W. & Bryson, V. — Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. *J. Bacteriol.*, 64:489-499, 1952.
20. Toledo, M.R.F.; Zuliani, M.E. & Trabulsi, L.R. — Single and transferable resistance among clinically isolated *Shigella* strains. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 1:1-11, 1970.
21. Watanabe, D.S.A. — Contribuição ao estudo do crescimento de *Escherichia coli* sensível e resistente à drogas por mutação e aquisição de fatores R. Tese de Doutoramento Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, São Paulo, 1973.

Os resultados podem ainda explicar a raridade do encontro de mutantes duplo e triplo, na natureza, envolvendo a participação de resistência para tetraciclina, cloranfenicol e canamicina em enterobactérias, uma vez que este tipo de resistência é quase sempre mediado por fator R (3, 10, 11, 16). Por outro lado, já foi verificado (20) que a resistência simultânea à sulfadiazina e à estreptomicina, em *Shigella*, pode ser determinada por fator R ou por mutação, correspondendo exatamente àqueles mutantes cuja capacidade de crescimento não foi substancialmente alterada.

## Agradecimento

Ao Prof. Dr. Luiz Rachid Trabulsi, o reconhecimento e a gratidão da autora pela orientação do presente trabalho.

## Identification of an ester of phthalic acid from the lipids of *Corynebacterium diphtheriae* PW8\*

Sérgio Roberto Andrade Leite,  
Amabile Kazuko Matida  
& Thuioshi Ioneda\*\*

### Summary

An ester of phthalic acid was isolated and purified by chromatographic techniques from the acetone-soluble lipids of *Corynebacterium diphtheriae* PW8. Its characterization was carried out by infrared, nuclear magnetic resonance, and mass spectrometry. Phthalic acid moiety is esterified by a branched primary alcohol containing eight carbon atoms. A tentative structure for the compound was proposed: bis (2-ethylhexyl) phthalate.

### Resumo

*Identificação de um éster de ácido ftálico encontrado entre os lipídeos de Corynebacterium diphtheriae PW8*

O isolamento do éster de ácido ftálico, a partir dos lipídeos solúveis em acetona, de *Corynebacterium diphtheriae*, foi efetuado por métodos cromatográficos. A caracterização foi feita por ressonância magnética nuclear e espectrometrias no infravermelho e de massa. A parte ácida é esterificada por álcool primário ramificado, contendo oito átomos de carbono. A possível estrutura da fração isolada é proposta: biftalato de 2-etyl-hexila.

### Introduction

The occurrence of an ester of phthalic acid in the lipids of *Mycobacterium tuberculosis* Brévannes was described (1) and suggested that the alcohol moiety would contain eight carbon atoms, but structural characterization was not shown.

A similar compound was described in the lipids of *Corynebacterium diphtheriae* (2), but the alcohol moiety not characterized.

Isolation and the characterization of the phthalate from the lipids of *Corynebacterium diphtheriae* PW8 is now described.

### Material and Methods

**Organism** — The cells of *Corynebacterium diphtheriae* PW8 were obtained from the Insti-

tuto Pinheiros, São Paulo, Brasil, (Synthex Laboratories Division), suspended in distilled water, and collected by centrifugation; this washing procedure was repeated twice.

**Chemicals** — Palmitic acid was from Sigma Chemical Co., Saint Louis, Mo. U.S.A.; methyl palmitate was prepared by methylation of palmitic acid with ethereal solution of diazomethane (7).

**Chromatographic procedures** — For column chromatography the following adsorbents were used: silicic acid (100 mesh, Mallinckrodt Chemical Works, Mo., U.S.A.); silica gel (British Drug Houses, Poole, England) and aluminium oxide (E. Merck·A.G., Darmstadt, Germany). Thin-layer chromatography was carried out on silica gel H plates (E. Merck, A.G., Darmstadt, Germany) in n-hexane-ethyl ether — acetic acid

\* Partly supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and partly by FORGE (Fund Overseas Research Grant and Education).

\*\* Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 20780, 01000 São Paulo, SP, Brasil

(83:16:1, v/v/v) (5). Spots were detected under ultraviolet light after spraying the plate with 0.05% rhodamine B in ethanol-water (1:1, v/v), instead of ethanol — water (95:5, v/v) (6).

**Extraction and fractionation of lipids** — Lipids were extracted with ethyl-ether-ethanol (1:1, v/v) and fractionated in ethyl ether-acetone (1:3, v/v) as described previously (4).

**Isolation of the phthalic acid derivative** — The bulk of the free-fatty acids was separated from the acetone-soluble lipids by column chromatography on aluminium oxide. In this preliminary purification, the column was eluted successively with petroleum ether, benzene, benzene-ethyl ether (3:1, v/v) benzene-ethyl ether (1:1, v/v), ethyl ether, then with ethyl ether-acetic acid (95:5, v/v). The fractions of petroleum ether, benzene, benzene-ethyl ether (3:1, v/v), benzene-ethyl ether (1:1, v/v) were pooled. This material (12g) was loaded on a column of aluminium oxide (3 x 30cm) and eluted with 1000ml each of the following solvents: petroleum ether, petroleum ether-benzene (1:1, v/v), benzene, benzene-ethyl ether (1:1, v/v), ethyl ether and ethyl ether-acetic acid (95:5, v/v); 250ml fractions were collected. The first petroleum ether eluate gave about 5g of residue, which were repurified on a column of silica gel (2 x 55cm) and elution was carried out with 500ml each of the following solvents: petroleum ether, petroleum ether-benzene (1:1, v/v), benzene, benzene-ethyl ether (1:1, v/v), ethyl ether and methanol; 100ml fractions were collected. Petroleum ether-benzene (1:1, v/v) fractions were pooled and the solvent-free residue was extracted with methanol. The material soluble in methanol (1.3g) was layered on a column of silicic acid (2 x 40cm); elution was carried out with 350ml each of the following solvents: petroleum ether, petroleum ether-benzene (3:1, v/v), petroleum ether-benzene (1:1, v/v) and benzene. The second fraction (from a total of two) of petroleum ether-benzene (1:1, v/v) gave 185mg of a slightly yellowish liquid residue.

**Physical methods** — Ultraviolet spectrum was carried out on a Beckman DU spectrometer in a n-hexane (10 µg/ml). Nuclear magnetic resonance spectrum was obtained on a T-60 Varian spectrometer in carbon disulphide (30 mg/ml), and chloroform was used as internal standard ( $\delta$ : 7.25 ppm). Infrared spectrum was obtained

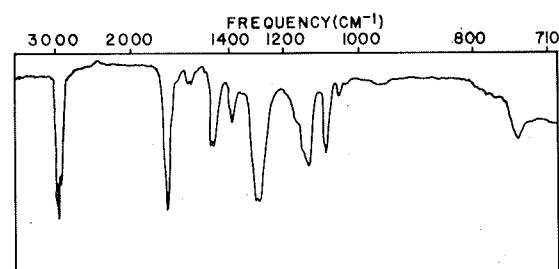
as solvent-free film on a Perkin-Elmer, model 21 infrared spectrometer. Mass spectrum was obtained in MS-9 mass spectrometer at 70 eV.

**Microtitration** — It was carried out with ethanolic potassium hydroxide by using a Gilmont Ultramicroburet (Manostat Corporation, New York, U.S.A.), the sample and the standard (palmitic acid) were dissolved in benzene (1 mg/ml). Ethanolic phenolphthalein (0.1%) was used as indicator; the solution was mixed with a stream of nitrogen.

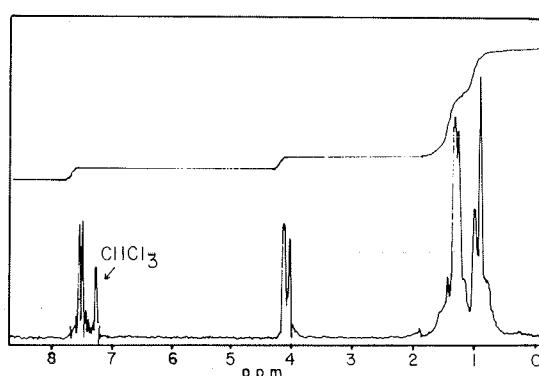
## Results

The liquid material, isolated from partially fatty acid-free acetone-soluble lipids of *Corynebacterium diphtheriae* PW8, exhibited only one spot with Rf 0.54 in n-hexane-ethyl ether-acetic acid (83:16:1, v/v/v). In the same solvent, the values of Rf of palmitic acid and of methyl palmitate were 0.24 and 0.72, respectively. The fraction isolated did not consume ethanolic solution of potassium hydroxide. Its ultraviolet spectrum exhibited a fast decreasing in optical density from 220 to 250nm. The infrared spectrum (Fig. 1) showed the following assignments: the band in the region of  $740\text{cm}^{-1}$  associated with in-phase, out-of-plane deformation of the four hydrogens of the aromatic ring; the bands in the region of  $1075$  and  $1120\text{cm}^{-1}$  due to the disubstituted aromatic ring; a very strong band corresponding to C-O of ester group at  $1280\text{cm}^{-1}$ ; the C-CH<sub>3</sub> stretching frequency for CH<sub>3</sub> groups observed near  $1380\text{cm}^{-1}$ ; the band corresponding to C-CH<sub>2</sub> stretching frequency for CH<sub>2</sub> groups at  $1470\text{cm}^{-1}$ ; the C=C in-plane vibrations of the aromatic ring at the region of  $1600\text{cm}^{-1}$ ; the C=O stretching frequency of ester group at  $1740\text{cm}^{-1}$ ; the C-H stretching fre-

**Figure 1** — Infrared spectrum of the fraction isolated from the acetone-soluble lipids of *Corynebacterium diphtheriae* PW8, as solvent — free film recorded on Perkin-Elmer model 21 infrared spectrometer



**Figure 2** — Nuclear magnetic resonance spectrum of the fraction isolated from the acetone-soluble lipids of *Corynebacterium diphtheriae* PW8 in carbon disulphide (30mg/ml); chloroform was the internal standard

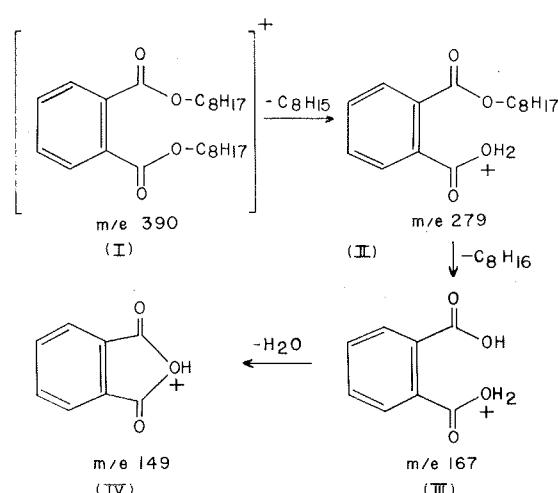


quency for  $\text{CH}_3$  and  $\text{CH}_2$  groups in the region between  $2850$  and  $2950\text{cm}^{-1}$ .

Nuclear magnetic resonance spectrum (Fig. 2) showed the following peaks: at  $0.9\text{ppm}$  due to the methyl terminal; at  $1.2\text{ppm}$  for methylene groups; at  $4.2\text{ppm}$  for methylene group of  $\text{O}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{CH}_2}}-\text{C}-$ grouping, and at  $2.4\text{ppm}$  corresponding to four hydrogens of the aromatic ring.

The peaks on the mass spectrum (Fig. 3) were assigned, according to the Fig. 4, as follows: at  $m/e 390$  for the molecular ion  $\text{M}^+$  (I); at  $m/e 279$  (II) due to the loss of a fragment  $\cdot\text{C}_8\text{H}_{15}$ ; at  $m/e 167$  (III) representing an additional loss of a fragment  $\cdot\text{C}_8\text{H}_{16}$ ; at  $m/e 149$  (IV) due to the further loss of water. Other two peaks were assigned at  $m/e 361$  and  $333$ .

**Figure 4** — Proposed fragmentation by mass spectrometry of the fraction isolated from the acetone-soluble lipids of *Corynebacterium diphtheriae* PW8

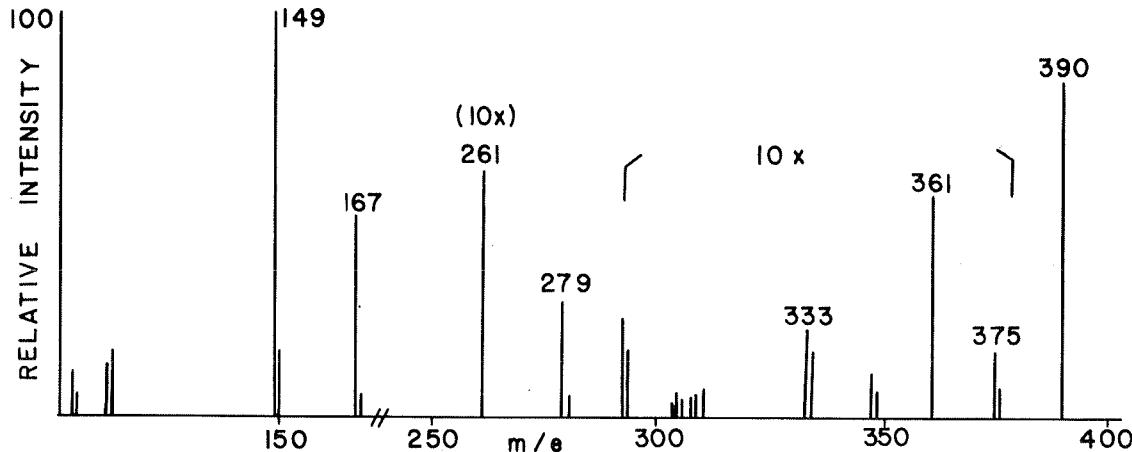


## Discussion

The fraction isolated from the lipids of *Corynebacterium diphtheriae* PW8 which exhibited only one spot on thin-layer chromatography, was neutral by titration.

The bands observed at  $740$ ,  $1075$  and  $1120\text{cm}^{-1}$ , suggested that the substance contained a disubstituted aromatic ring. The absence of a band at  $720\text{cm}^{-1}$  for in-chain methylene groups suggested that the number of successive methylene groups in the alkyl chain would be lower than four. The integration of the peaks of nuclear magnetic resonance spectrum showed that the peak at  $4.2\text{ppm}$  had an area equal

**Figure 3** — Mass spectrum carried out on MS-9 mass spectrometer at  $70\text{eV}$



to that of the peak at 7.6 ppm, which represented the four adjacent hydrogens of the aromatic ring. On the other hand, the peak at 4.2 ppm was assigned for methylene group ( $O-CH_2-$ ) adjacent to tertiary carbon atom.

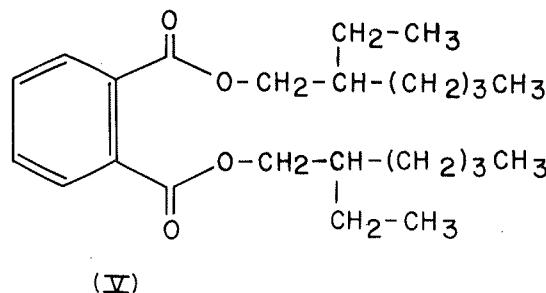
The presence of a peak at m/e 390, 279, 167, 149 in the mass spectrum corresponded to a diester, in which phthalic acid was esterified by two molecules of alcohol containing eight carbon atoms. The area of the peak at 0.9 ppm, corresponding to the methyl terminal, suggested the presence of four methyl groups. The

peaks at m/e 361 and 333 might be due to the loss of  $\cdot C_2H_5$  or  $\cdot C_4H_9$ , respectively. Therefore, these results might conform with the structure (V) (Fig. 5) proposed for the isolated compound.

The occurrence of the butylphthalate in certain lipids of bacterial sources would be due to contamination (3).

It has been proposed that the phthalic acid of *Mycobacterium tuberculosis* would derive from phthiocol (2-hydroxy-3-methyl 1,4 naphthoquinone) (1). Therefore, a systematic study on the phthalates from several strains of *Corynebacterium* and *Mycobacterium* would be necessary to elucidate the origin of such compounds.

**Figure 5** — Proposed structure of the fraction isolated from the acetone-soluble lipids of *Corynebacterium diphtheriae* PW8: bis (2-ethylhexyl) phthalate



### Acknowledgements

We are indebted to Dr. F.G. da Nóbrega for reading the manuscript and to Dr. D.W. Thomas (Stanford Research Institute) for helpful discussions on the interpretation of mass spectrum.

### References

1. Aebi, A.; Asselineau, J. & Lederer, E. — Sur les lipides de la souche humaine "Brévannes" de *Mycobacterium tuberculosis*. Bull. Soc. Chim. Biol., 35:661-684, 1953.
2. Asselineau, J. — Sur la composition des lipides de *Corynebacterium diphtheriae*. Biochim. Biophys. Acta, 54:359-360, 1961.
3. Etemadi, A.H. — Sur l'origine du phtalate de butyle dans les extraits lipidiques bactériens. Bull. Soc. Chim. Biol., 45:631-633, 1963.
4. Ioneda, T.; Lenz, M. & Pudles, J. — Chemical constitution of a glycolipid from *Corynebacterium diphtheriae* PW8. Biochem. Biophys. Res. Comm., 13:110-114, 1963.
5. Lombardi, B. & Schotz, M.C. — Incorporation of 1-<sup>14</sup>C-palmitate into liver and serum triglycerides of choline deficient rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 112:400-401, 1963.
6. Wagner, H.; Hörlimmer, L. & Wolf, P. — Dünnenschichtchromatographie von Phosphatiden und Glycolipiden. Biochem. Z., 334:175-184, 1961.
7. Vogel, A.I. — A Textbook of practical organic chemistry. 3rd Edition, London, Longman, 1972.

