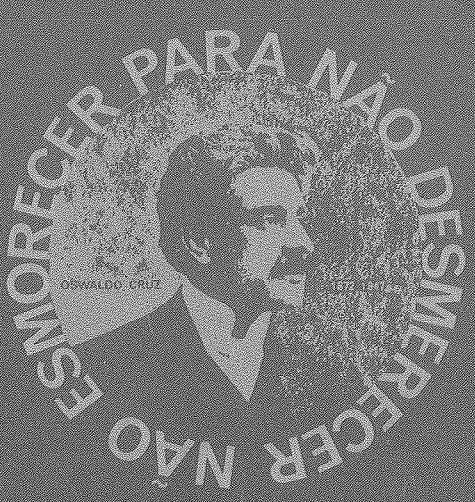


Volume 9 Número 2 Abril-Jun. 1978

# Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia  
São Paulo — Brasil







## 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

<b>Diretoria</b>	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 agrupar 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 ( $\text{\AA}$ ;  $10^{-10}m$ ). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ( $\mu g/ml$ ) ou microlitros por litro ( $\mu \text{litros/litro}$ ). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

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

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

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

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

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** — No texto, as referências devem ser citadas por número. Os sobrenomes, de dois autores devem ser separados por &; quando houver mais de dois autores, a separação é feita por ponto e vírgula e o último por &. Na secção **Referências Bibliográficas**, as citações devem ser por ordem alfabética de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas sequencialmente. Os artigos em periódicos devem ser citados na seguinte ordem: nome(s) do(s) autor(es) em maiúsculas 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 comprehensíveis, 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 reticulas devem ser feitas em papel brillante, 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

Abril-Junho 1978

Número 2

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 9 (2)

## CONTEÚDO

## CONTENTS

---

Clara Pechmann Mendonça & Carlos Solé-Vernin	55	<i>Estafilococos hospitalares</i>	<i>Study of hospitals Straphylococcus</i>
Arléte S. Martini Carlos Solé-Vernin & Elvira M.C. da Silva	62	<i>Aspectos bacteriológicos e epidemiológicos na glomerulonefrite difusa aguda (pós-estreptocócica) de casos esporádicos em Londrina, PR</i>	<i>Bacteriological and epidemiological aspects of acute post-streptococcal glomerulonephritis in sporadic cases from Londrina, PR</i>
D. P. Falcão J. J. Farmer III & V. R. Dowell Jr.	71	<i>Distinção entre Yersinia enterocolitica e de Yersinia pseudotuberculosis frente a antibióticos e quimioterápicos</i>	<i>Differentiation between Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis by using antibiotics and chemotherapeutic agents</i>
A. F. Pestana de Castro O. Campedelli Filho & E. Waisbich	74	<i>Micobactérias oportunistas isoladas de nódulos linfáticos mesentéricos de suínos aparentemente normais em São Paulo, Brasil</i>	<i>Opportunist mycobacteria isolated from the mesenteric lymph nodes of apparently healthy pigs in São Paulo, Brazil</i>
Cenira Vanacor Barroso & A. M. de Jesus Nonato	84	<i>Influência de fatores de crescimento em Chlorella</i>	<i>The influence of growth factors upon Chlorella</i>
F. P. de França & M. C. Yuan	88	<i>Influência da concentração de NaNO<sub>3</sub> na produção de biomassa de Chlorella homosphaera</i>	<i>Influence of the NaNO<sub>3</sub> concentration on the production of Chlorella homosphaera biomass</i>
Fúlvio José Alice	92	<i>Isolamento e caracterização parcial de um tipo de herpesvírus bovino</i>	<i>Isolation and partial characterization of a type of bovine herpesvirus</i>
José M. S. Mezêncio Romain R. Golgher Maria de L. P. Peixoto & Paulo César P. Ferreira	97	<i>Propriedades da interferência causada pelo vírus Marituba</i>	<i>Properties of interference caused by Marituba virus</i>

---

**Sociedade Brasileira de Microbiologia**

*Sócios Patrocinadores*

**BIOLAB-MÉRIEUX — Produtos para Laboratórios Ltda.**

**Eli Lily do Brasil Ltda.**

**Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.**

## Estafilococos hospitalares

Clara Pechmann Mendonça\*  
 & Carlos Solé-Vernin\*\*

### Resumo

Em 1970-71; 1974 e 1975, coletou-se material de processos infecciosos adquiridos em um hospital Geral de Araraquara. Embora o número de processos infecciosos tenha aumentado, nas últimas etapas de estudo foram isoladas poucas amostras de *Staphylococcus aureus*. A etiologia das infecções passou, praticamente, para as bactérias Gram negativas. Em nosso trabalho levamos em consideração não só a espécie bacteriana, mas realizamos, além da fagotipagem, o antibiograma, o estudo dos modelos de Barber & Burston e o comportamento frente ao íon mercúrico.

Os estafilococos isolados mostraram-se com alta resistência frente aos antibióticos testados. Entre as amostras coletadas em 1975, surgiram grandes variações, especialmente, com relação ao Cloranfenicol, e em consequência houve alteração nos modelos de Barber e Burston. A prova do íon mercúrico revelou-se bastante importante na caracterização das amostras hospitalares. Foram identificadas amostras consideradas "perigosas", demonstrando que essas bactérias, embora em menor número, estão adaptadas ao ambiente hospitalar, exigindo medidas preventivas racionais.

### Summary

#### *Study of hospitals Staphylococcus*

In the years 1970-1971; and 1975, it was collected material of infections processes acquired in a public hospital in Araraquara.

Althought the number of the infections processes was higher, the number of samples of *Staphylococcus aureus* isolated was few. The etiology of the infections proceeded practily to Gram negatives bacteria.

In on research, we took in consideration not only the bacterian specie, but beyond the fagotyping, we made the Antibiogram, the study of Barber & Burston's patterns, and the behaviom face to Mercuric ion.

The isolated *Staphylococcus* showed a hight resistance face to the experimented antibiotics. Among the samples collected in 1975, appeared great variations, specially with regard to Cloranfenicol, and consequently the Barber & Burston's patterns were altered. The Mercuric ion test was very important to the characterization of the hospitals samples. Samples considered dangerous were identifyed, demonstrating that those bacteria, even in less number, are adapted to the hospital midle, needing rational preventive measures.

### Introdução

A significante morbidade e mortalidade causada por *Staphylococcus aureus* pode ser avaliada pelo aparecimento de numerosas publicações a respeito, em todo o mundo, relacionadas, especialmente, com estafilococcos hospitalares. É bem verdade que hoje se enfrenta toda gama de agentes etiológicos, causando

as mais diversas infecções.

Tem, porém, o estafilococo desafiado os órgãos de Saúde Pública, talvez devido a sua grande mutabilidade (STAMM\*\*\*), confirmando-se, ainda depois de 20 anos, os dizeres do Editorial Lancet (21) "The Unconquered *Staphylococcus*".

\* Departamento de Ciências Bio-Clínicas, Fac. Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, 14.800 Araraquara, SP.

\*\* Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Fac. de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 14.100 Ribeirão Preto, SP

\*\*\* Comunicação pessoal.

Com o aparecimento dos antibióticos e o seu uso, às vezes indiscriminado, o problema tornou-se sério, principalmente para os hospitais. Nota-se que houve aumento de processos infecciosos, adquiridos pelos pacientes, durante a permanência no hospital, causados por bactérias Gram negativas. Porém, os Estafilococos apresentam-se com características especiais, sugerindo a presença de nova linhagem.

As amostras selecionadas, parece que são mais "perigosas", porém, não se observam mais os grandes surtos epidêmicos e as infecções por esta bactéria são mais de caráter endêmico ou surtos envolvendo poucos pacientes (8, 17).

Na presente observação pretendemos: a — verificar a evolução da resistência aos antibióticos através do tempo; b — verificar o possível valor da prova do íon mercúrico, correlacionando os seus resultados com os do antibiograma para a caracterização da amostra hospitalar.

## Material e Métodos

**Coleta** — Coletamos material de pacientes que adquiriram processos infecciosos durante a sua permanência no hospital e as infecções apresentadas foram as mais variadas: supuração em incisão cirúrgica, casos de diarréia-díserteria, afecção dermatológica, fleimão, infecção urinária, etc.

Para a coleta das secreções utilizamos zaragatoa umedecida em caldo nutritivo.

Consideramos o estafilococo como agente causal de diarréia quando a sua presença em exames diretos e em cultura era numerosa (12).

A coleta se estendeu por três períodos: a — fevereiro de 1970 a fevereiro de 1971; b — janeiro a novembro de 1974; c — janeiro a maio de 1975.

**Semeadura e Identificação** — Utilizamos o meio de Manitol Salt Agar (BBL) e para identificar e diferenciar realizamos as provas de catalase, oxidação e fermentação da glicose (1). Através da microscopia de esfregaços corados pelo método de Gram, estudamos a pureza das culturas e quando contaminadas, especialmente por Bactérias Gram negativas, foram tratadas pelo éter etílico (5, 20).

Isolado o estafilococo, realizamos a prova da coagulase em tubo com sangue oxalatado de coelho normal (4, 5) com leituras em 1, 2, 4, 18 e 24 horas a 37°C., diferenciando as espécies.

Para caracterização do germe isolado, realizamos as seguintes provas:

**Antibiograma** — Utilizamos a técnica da difusão em meio sólido a partir de discos impregnados em antibióticos, segundo o método de Bauer-Kirby (3), com revisão de Rocha & col. (19).

Os antibióticos e suas respectivas doses por disco e a sigla usada foram as seguintes:

Penicilina G.	10 unid	P	Esteptomicina	30 mcg	E
Cloranfenicol	30 mcg	C	Tetraciclina	30 mcg	T
Ampicilina	10 mcg	A	Meticilina	5 mcg	M
Cefaloridina	30 mcg	Ce	Gentamicina	10 mcg	G
Ac. Nalidixico	30 mcg	Na	Fosfomicina	50 mcg	F

Os discos de fosfomicina foram fabricados pela Companhia Espanhola de Penicilina e Antibióticos e os demais pelos Laboratórios Difco, que foram submetidos ao nosso controle com amostras de *Staphylococcus Oxford*, 209.

Utilizamos os estafilococos a serem testados, em culturas jovens, de não mais de 18 horas de incubação, que eram levadas para tubos contendo caldo infuso até dar turvação correspondente à obtida, com solução padrão de cloreto de bário.

Através de zaragatoa, embebida nesse meio, semeamos em placas de Petri contendo meio de Mueller-Hinton (Difco), que foram levadas à estufa a 37°C, para secagem superficial, por mais ou menos 15 minutos.

Posteriormente, os discos foram distribuídos, deixando-se, por período de 2 horas, em temperatura ambiente para a pré difusão do antibiótico ao meio de cultura e depois incubados a 37°C.

Após 24 horas, fez-se a leitura para todos os antibióticos, menos para a meticilina, que permaneceu por 48 horas (7).

Para a leitura usamos R como indicativo de resistência e S de sensibilidade.

Com os quatro primeiros antibióticos, penicilina, esteptomicina, cloranfenicol e tetraciclina, formamos os modelos de Barber & Burston Barber & Burston (2).

**Prova do íon mercúrico** — Submetemos os estafilococos à ação do íon mercúrico (6, 16) na tentativa de surpreender amostras epidemiologicamente importantes para o meio hospitalar.

O cloreto de mercúrio usado foi o de J.T. Baker, numa concentração de 1:35.482. Essa solução foi testada com as amostras fornecidas pelo Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, U.S.P., que haviam respondido, satisfatoriamente, em divisão dicotómica na concentração 1:34.333.

Utilizamos, sempre, uma cultura de não mais de 18 horas em meio de Hitchens. O inóculo foi levado ao meio através de uma alça de 3 mm. de diâmetro, utilizando-se um escantilhão dividido em 12 áreas arredondadas de 1 cm. de diâmetro, que foi colocado embaixo da placa.

A leitura foi feita após 24 horas de incubação a 37°C, utilizando R como símbolo de resistência e S como sensibilidade.

## Resultados

Consideramos os resultados de acordo com as etapas de coleta do material.

1 — Estudo dos Estafilococos obtidos na amostragem de 1970-1971.

Só foram consideradas infecções adquiridas no hospital, quando o paciente se encontrava no ambiente há mais de 48 horas e cuja causa da internação não se relacionava com o processo adquirido.

1.1 — *Antibiograma* — Os resultados do antibiograma dos estafilococos isolados dos 133 casos de infecções adquiridas em hospital durante esse período, encontram-se na Tabela 1.

1.2 — *Modelos de Barber & Burston* — Com os antibióticos penicilina, estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina, formamos os modelos

**Tabela 1** — Comportamento dos estafilococos causadores de infecções intra-hospitalares, frente a 10 antimicrobianos — 1970-1971.

Antibióticos	Resistentes		Sensíveis	
	n. <sup>o</sup>	%	n. <sup>o</sup>	%
P.	110	82,7	23	17,3
E.	125	94,0	8	6,0
C.	75	56,4	58	43,6
T.	83	62,4	50	37,6
A.	98	73,7	35	26,3
M.	102	76,7	31	23,3
G.	55	41,4	78	58,6
Ce.	21	15,8	112	84,2
Na.	126	94,7	7	5,3
F.	6	4,5	127	95,5

chamados de Barber & Burston cujos resultados são encontrados na Tabela 2.

Entre os treze modelos formados, reconhecemos vários chamados de peculiares (20), isto é amostras que se afastaram da normalidade no comportamento frente aos antibióticos.

1.3 — *Prova do íon mercúrico* — Obtivemos 47 (35,3%) amostras Hg<sup>++</sup> S e 86 (64,7%) amostras Hg<sup>++</sup> R. Na Tabela 3 encontramos a correlação dos resultados do antibiograma, segundo Barber & Burston e a prova do íon mercúrico.

2 — Estudo dos estafilococos obtidos na amostragem de 1974.

2.1 — *Antibiograma* — Os resultados das 58 amostras de estafilococos isolados de casos de infecções intra-hospitalares, encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 2** — Modelo de Barber & Burston — amostras coletadas em 1970-1971

Modelo de Barber & Burston	n. <sup>o</sup>	%		
			R	S
RRRR	53	39,8	39	60
RRRS	10	7,5	7	3
RRSR	21	15,8	15	6
RSRR	1	0,7	0	1
SRRR	3	2,3	2	1
RRSS	22	16,5	16	6
RSRS	1	0,7	0	1
RSSR	2	1,5	1	1
SRRS	3	2,3	2	1
SRSR	2	1,5	1	1
SSRR	1	0,7	0	1
SRSS	11	8,3	8	3
SSRS	3	2,3	2	1

**Tabela 3** — Correlação entre os resultados do antibiograma, segundo Barber & Burston e a prova do íon mercúrico — 1970-1971

Modelo de Barber & Burston	ion mercúrico R		ion mercúrico S	
	n. <sup>o</sup>	%	n. <sup>o</sup>	%
RRRR	46	34,6	7	5,3
RRRS	7	5,3	3	2,3
RRSR	18	13,5	3	2,3
RSRR	0	0,0	1	0,7
SRRR	2	1,5	1	0,7
RRSS	6	4,5	16	12,0
RSRS	1	0,7	0	0,0
RSSR	1	0,7	1	0,7
SRRS	0	0,0	3	2,3
SRSR	0	0,0	2	1,5
SSRR	0	0,0	1	0,7
SRSS	5	3,8	6	4,5
SSRS	0	0,0	3	2,3
TOTAL	86	64,7	47	35,3

**Tabela 4** — Comportamento dos estafilococos causadores de infecções intra-hospitalares, frente a 10 antimicrobianos 1974

Antibióticos	Resistentes		Sensíveis	
	nº	%	nº	%
P.	52	89,7	6	10,3
E.	52	89,7	6	10,3
C.	39	67,2	19	32,8
T.	54	93,1	4	6,9
A.	50	86,2	8	13,8
M.	50	86,2	8	13,8
G.	17	29,3	41	70,7
Ce.	23	39,6	35	60,3
Na.	51	87,9	7	12,1
F.	6	10,3	52	89,7

**2.2 — Modelos Barber & Burston** — Seguimos a mesma metodologia de trabalho usada na amostragem de 1970-1971 e os resultados dos modelos de Barber & Burston encontram-se na Tabela 5.

**2.3 — Prova do íon mercúrico** — Obtivemos 47 (81,0%) amostras de Hg<sup>++</sup> R e 11 (19,0%) amostras Hg<sup>++</sup> S. A correlação entre a prova do íon mercúrico e os modelos de Barber & Burston encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 5** — Modelos de Barber & Burston — amostras coletadas em 1974

Modelo de Barber & Burston	nº	%
RRRR	32	55,2
RRSR	11	19,0
RRRS	1	1,7
RSRR	1	1,7
SRRR	5	8,6
RSSR	4	6,9
RRSS	2	3,4
SRSR	1	1,7
RSSS	1	1,7
<b>TOTAL</b>	<b>58</b>	<b>100,0</b>

**Tabela 6** — Correlação entre os resultados do antibiograma, segundo Barber & Burston e a prova do íon mercúrico — 1974

Modelo de Barber & Burston	íon mercúrico R		íon mercúrico S	
	nº	%	nº	%
RRRR	30	51,7	2	3,4
RRSR	11	19,0	0	0,0
RRRS	0	0,0	1	1,7
RSRR	1	1,7	0	0,0
SRRR	1	1,7	4	6,9
RSSR	2	3,4	2	3,4
RRSS	1	1,7	1	1,7
SRSR	1	1,7	0	0,0
RSSS	0	0,0	1	1,7
<b>TOTAL</b>	<b>47</b>	<b>81,0</b>	<b>11</b>	<b>19,0</b>

**3 — Estudo dos estafilococos obtidos na amostragem de 1975.**

Observamos, nesse período, uma diminuição acentuada da presença de estafilococos, passando a etiologia das infecções intra-hospitalares quase só por bactérias Gram negativas.

Na realidade, os dados encontrados não diferem dos achados em várias partes do mundo (STAMM\*).

**3.1 — Antibiograma** — Os resultados dos estafilococos coletados em processos infecciosos intra-hospitalares em 1975, frente aos antimicrobianos encontram-se na Tabela 7.

**3.2 — Modelos de Barber & Burston** — Os modelos de Barber & Burston, entre amostras coletadas em 1975, encontram-se na Tabela 8.

Verificamos uma predominância do modelo RRSR com 23 (59,0%) amostras, assim como um número menor de modelos de Barber & Burston.

**3.3 — Prova do íon mercúrico** — Esses estafilococos apresentam maior número de amostras Hg<sup>++</sup> R (33 - 84,6%). A correlação des-

**Tabela 7** — Resultado do comportamento dos estafilococos causadores de infecções hospitalares, frente a 10 antimicrobianos — 1975

Antibióticos	Resistentes		Sensíveis	
	nº	%	nº	%
P.	0	0,0	39	100,0
E.	9	23,1	30	76,9
C.	31	79,5	8	20,5
T.	6	15,4	33	84,6
A.	1	2,6	38	97,4
M.	6	15,4	33	84,6
G.	25	64,1	14	35,9
Ce.	33	84,6	6	15,4
Na.	4	10,3	35	89,7
F.	28	71,8	11	28,2

**Tabela 8** — Modelos de Barber & Burston — amostras coletadas em 1975

Modelo de Barber & Burston	nº	%
RRRR	5	12,8
RRSR	23	59,0
RRRS	1	2,6
RSRR	2	5,1
RSSR	3	7,7
RRSS	1	2,6
RSSS	4	10,3
<b>TOTAL</b>	<b>39</b>	<b>100,0</b>

\*Comunicação pessoal.

sa resistência com a apresentada à tetraciclina (84,6%), à meticilina (84,6%), e à penicilina (100,0%), fala favoravelmente da presença de amostras "perigosas".

Os resultados da correlação entre a prova do íon mercúrico e o antibiograma segundo Barber & Burston encontram-se na Tabela 9.

**Tabela 9** — Correlação entre os resultados do antibiograma, segundo Barber & Burston e a prova do íon mercúrico — 1975

Modelo de Barber & Burston	íon mercúrico R		íon mercúrico S	
	nº	%	nº	%
RRRR	4	10,3	1	2,6
RRSR	18	46,2	5	12,8
RRRS	1	2,6	0	0,0
RSRR	2	5,1	0	0,0
RSSR	3	7,7	0	0,0
RRSS	1	2,6	0	0,0
RSSS	4	10,3	0	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>33</b>	<b>84,6</b>	<b>6</b>	<b>15,4</b>

## Discussão

Em nossa primeira investigação isolamos estafilococos em 133 processos infecciosos, número bem elevado em relação ao conseguido nas etapas 1974 e 1975. Em 1970-1971, conseguimos surpreender surtos epidêmicos em várias partes do hospital, inclusive um na maternidade envolvendo 15 pacientes. Esse surto foi causado por amostras RRRR do modelo de Barber & Burston e lisadas pelo fago experimental 95 (13). Nas duas últimas etapas verificamos um número elevado de processos infecciosos, causados por bactérias Gram negativas (14).

*Antibiograma* — O método da difusão com discos impregnados em antibióticos, por nós escolhido, é recomendado pela Organização Mundial de Saúde e usado no "Center for Diseases Control", Atlanta, USA.

Apesar de o antibiograma ser um critério dinâmico e variável, representando um dado momento na biologia de uma amostra (23), em nossa observação demonstra uma certa seqüência nas diferentes fases que estudamos, especialmente se levarmos em consideração apenas a penicilina, estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina.

Analizando a Tabela 1 vemos que a estreptomicina com 125 (94%) amostras resistentes, demonstrou capacidade de resistência superior à penicilina (110 - 82,7%), isso se justificando, devido ao mecanismo de produção de mutantes R pelo primeiro antibiótico. Isto se verifica também na Tabela 4 e com ligeira diferença na Tabela 7. A tetraciclina, segundo Williams (25) pode ser usada como característica de grande significado na diferenciação de amostras epidêmicas. Entre nós, apesar de fornecer resultados de alta significação, sentimos que a penicilina é ainda um importante marcador de amostras de estafilococos hospitalares.

Há também numerosas referências em relação a meticilina, demonstrando que esse antibiótico serve como marcador de amostras de caráter epidêmico (10, 11, 15).

Whitehead (24), fazendo uma revisão verificou que em 1960, em hospitais da Inglaterra, fora encontrado 1% de estafilococos meticilino resistentes e que em 1970 atingia a 4,6% na região de Newcastle, em 1969 isolaram-se 35% de estafilococos meticilino resistentes e em 1970 encontraram-se 58%.

Ridley & col. (18), verificaram num hospital de Londres que houve um aumento de resistência à meticilina, porém o número de infecções por estafilococos, e a resistência a muitos outros antibióticos, diminuiria.

A resistência ao cloranfenicol foi elevada entre as amostras de 1970-1971 e de 1974, caindo consideravelmente em 1975, e por informações diretas do Hospital soubemos que o uso deste antibiótico diminuiu a partir do mês de julho de 1974. Essa queda da resistência ao cloranfenicol também foi observada por Lacey (comunicação pessoal), quando estudada o comportamento dos estafilococos frente a vários antibióticos e esta apareceu depois de um período de pouco uso, o mesmo não tendo ocorrido com a penicilina, mesmo quando seu uso foi bem limitado.

Com a cefaloridina e gentamicina tivemos resultados bem próximos aos obtidos por Hutzler (8), porém, bem diferenciados dos de Ito (9), e para a fosfomicina houve um aumento de resistência nas várias etapas de observação.

Quanto aos modelos de Barber & Burston podemos verificar que em 1970-1971 obtivemos 39,8% do modelo RRRR enquanto, que, 1974 elevou-se para 55,2% e em 1975 atingiu a 12,8%, devido a modificação de comportamento frente ao cloranfenicol. Isso le-

vou também, a uma diferença sensível no modelo RRSR que em 1970-1971, apresentou 15,8% em 1974, 19,0% e em 1975, 59,0%.

*Ion mercúrico* — A resistência ao íon mercúrico foi bem acentuada nas três amostragens, indicando a predominância de cepas hospitalares.

Entre a população extra hospitalar podemos encontrar amostras  $Hg^{++} R$ , porém verificamos que há um predomínio das  $Hg^{++} S$ . Para Uthida Tanaka (22), em ambientes distantes do hospital, a proporção foi de 4/5 de  $Hg^{++} S$  para 1/5 de  $Hg^{++} R$ .

Apesar de existirem controvérsias sobre o valor de prova do íon mercúrico, Mendonça (13) encontra amostras de íon mercúrico resistentes, epidemiologicamente importante. Outros autores, entre eles, Solé-Vernin & Uthida Tanaka (20), demonstraram que as amostras de íon mercúrico resistentes, são as que têm condições de sobreviver em ambiente hospitalar.

Tivemos oportunidade de encontrar amostras  $Hg^{++} S$ , causando processos infecciosos, fato igualmente corroborado por Velazco-Donayre (23) e Moore (16) que fez menção de dois surtos epidêmicos que grassaram na Maternidade da Dinamarca com amostras  $Hg^{++} S$ .

Quando conjugado ao antibiograma, a prova do íon mercúrico pode fornecer a identidade da amostra de estafilococos, indicando-nos as de maior "periculosidade", salvo condições próprias dos pacientes.

Em nossa casuística, verificamos que as amostras que se apresentaram com maior resistência aos antibióticos, forneceram igualmente resistência ao íon mercúrico. Analisando a atuação clínica destes estafilococos, verificamos que, na maioria das vezes, foram responsáveis por processos infecciosos bem graves.

## Conclusões

1 — Embora o número de processos infecciosos adquiridos pelos pacientes, durante a sua permanência no hospital, não tenha diminuído, verificamos que foi bem menor a obtenção de amostras de estafilococos.

2 — Apesar dessa diminuição, verificamos que os processos infecciosos, na sua maioria, são mais intensos, apresentando, às vezes, complicações sérias.

3 — Os estafilococos isolados, mostraram-se com alta resistência frente aos antibióticos testados.

4 — A resistência ao cloranfenicol diminuiu consideravelmente entre os estafilococos na amostragem de 1975, depois de um período de quase restrição total do seu uso.

5 — Em consequência desta alteração sofrida frente ao cloranfenicol, houve modificação acentuada entre os modelos de Barber & Burston nesta amostragem.

6 — Embora existam grupos de pesquisadores indiferentes, ou mesmo de opinião contrária, ao valor da prova do íon mercúrico, os nossos dados levam-nos a aprovar o uso dessa técnica bastante simples, para melhor evidenciação da identidade dos estafilococos.

7 — Pelos resultados obtidos, considerando-se a resistência aos antibióticos e a prova do íon mercúrico, acreditamos que neste hospital existam amostras de fácil disseminação e bastante adaptadas ao meio ambiente.

## Agradecimentos

À Dra. Vera Lygia de Lourenço Guimarães, à Dra. Ana Maria Uthida Tanaka, ao Dr. Jorge Cury, e à Sra. Olga Coelho de Castro e a acadêmica Suzana Debora Ruff, pela colaboração prestada.

## Referências Bibliográficas

- Baird-Parker, A.C. — Methods classifying staphylococci and micrococci. In: Gibbs, B.N. & Skinner, F.A. — Identification methods for microbiologists. London, Academic Press, 59-64, 1966.
- Barber, M. & Burston, J. — Antibiotic-resistant staphylococcal infection. A study of antibiotic sensitivity in relation to bacteriophage types. Lancet, London, 578-582.
- Bauer, A.W & col. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Path., Baltimore, 45: (4), 493-496, 1966.
- Bayliss, B.G. & Hall, E.R. — Plasma coagulation by organisms other than staphylococcus aureus. J. Bact., Baltimore, 89: (1): 101-105, 1965.
- Blair, J.E. — Laboratory diagnosis of Staphylococcal infection. Bull. Wld. Hlth. Org., Geneva, 18: 291-307, 1958.

6. Green, S.M. — Mercury sensitivity of Staphylococci. J. Clin. Path., 15: 249-251, 1962.
7. Hewitt, J.H.; Coe, A.W. & Parker, M.T. — The detection of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microb., 2: 443-455, 1969.
8. Hutzler, R.V. & col. — Incidência de infecções hospitalares. Rev. Hosp. Clin., Fac. Med. Univ. S. Paulo, São Paulo, 28: (supl.) 1-7, 1973.
9. Ito, J.Y. — Caracterização e incidência de *Staphylococcus aureus* de cepas hospitalares. Ribeirão Preto, Faculdade de Farmácia e Odontologia, 1973. Tese — Livre Docência.
10. Kayser, F.H.; Benner, E.J. & Hoeprich, P.D. — Mode of resistance against B. Lactam antibiotics in Staphylococci. Ann. N. Y. Acad. Sci., New York, 182:106-117, 1966.
11. Kayser, F.H. & Mak, T.M. — Methicillin-resistant Staphylococci. Ann. J. Med. Sci., Philadelphia, 264: 197-205, 1972.
12. Mathias, J.R.; Shooter, R.A. & Williams, R.E.O. — *Staphylococcus aureus* in the faeces of Hospital patients. Lancet, London, (6980): 1172-1173, 1957.
13. Mendonça, C.P. — Estudos sobre *Staphylococcus aureus*. (porta dores e infecções hospitalares) num Hospital Geral de Araraquara, S.P. 1964-1975. Araraquara, Faculdade de Farmácia e Odontologia. UNESP, 1976. /Tese — Docência Livre.
14. Mendonça, C.P. & col. — Infecções hospitalares, no Município de Araraquara, S.P. (Brasil). Rev. Saúde públ. (S. Paulo), 10: 239-252, 1978.
15. Mitchel, M.F. & Priem, C.C. — Control at Hospital level of infections by methicillin-resistant staphylococci in children. J. Hyg. (Cambridge), 69: 453-470, 1971.
16. Moore, B. — A new screen test and selective medium for the rapid detection of epidemic strains of *Staphylococcus aureus*. Lancet, London, p. 453-458, 1960.
17. Parker, M.T. & col. — Endemic Staphylococcal Infections in Hospitals. Ann. N. Y. Acad. Sci., New York, p. 466-484, 1974.
18. Ridley, M. & col. — Antibiotic resistance *Staphylococcus aureus* and hospital antibiotics policies. Lancet, London, p. 230, 1970.
19. Rocha, H.; Zuliani, M.E. & Trabulsi, L.R. - Antibiogramas. Rev. Microbiol., 3: 51-60, 1972.
20. Solé-Vernin, C. & Uthida Tanaka, A.M. — A prova de Moore conjugada ao antibiograma na identificação das amostras hospitalares e não hospitalares de *Staphylococcus aureus*. Hospital, Rio de Janeiro, 75: 2043-2086, 1969.
21. The Unconquered Staphylococcus. Lancet, London, 2:755, 1955.
22. Uthida Tanaka, A.M. — Prevalência de *Staphylococcus aureus* em áreas de pele de indivíduos sem afecção cutânea piogênica. Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina U.S.P., 1967. /Tese — Doutoramento.
23. Velasco-Donayre, C. — Alguns aspectos das doenças estafilocócicas adquiridas em hospitais de Lima, Peru (1970-1972). Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia U.F.R.J., 1973. /Tese — Mestrado/.
24. Whitehead, J.E.M. — Bacterial resistance: changing patterns of some common pathogens. Brit. med. J., London, 2:224-228. 1973.
25. Williams, R.E.O. & col. — Hospital infection causes and prevention. 2 ed. London, Lloyd and Luke, 1966.

**Aspectos bacteriológicos e epidemiológicos  
na glomerulonefrite difusa aguda  
(pós-estreptocócica)  
de casos esporádicos em Londrina, PR\***

Arléte Scrassolo Martini\*\*

Carlos Solé-Vernin\*\*\*

& Elvira Maria Caldas da Silva\*\*\*\*

**Resumo**

Foi feito o estudo de 48 pacientes com glomerulonefrite difusa aguda, pós-estreptocócica, internados em três hospitais de Londrina, PR, bem como de 38 grupos familiais desses pacientes, para complementação epidemiológica. A piodeserite (principalmente impetigo) foi a infecção prévia à nefrite em 75% dos pacientes e esteve presente em 86,8% dos grupos familiais, enquanto o processo infecioso das vias aéreas superiores ocorreu na proporção de 14,6% dos pacientes e em 36,8% dos grupos familiais estudados. O meio de cultura (HPTH) e as condições de cultivo empregados para o isolamento do estreptococo Beta hemolítico do Grupo A permitiram o achado, incomum na literatura, de 100% de positividade entre os pacientes não medicados com substância antimicrobiana, antes da coleta de material para cultura, depois da manifestação da nefrite. O tipo mais frequente de estreptococo do grupo A foi o T14(49) (24,3%), seguido dos tipos do complexo T1 / 3/13 / B 3264 (19,5%), T12 (15,4%) e T Imp 19 (11,3%), todos considerados nefritogênicos. Além de outros tipos nefritogênicos isolados, duas novas combinações de fatores antigenicos já conhecidos foram encontradas nessa investigação: o T2/28 e T2/4. Houve 85,7% de simultaneidade do mesmo sorótipo entre pacientes não medicados com antibióticos e respectivos grupos familiais e, entre os pacientes medicados, encontraram-se 70,5% de seus grupos de família com, pelo menos, um tipo nefritogênico.

**Summary**

*Bacteriological and epidemiological aspects of acute post-streptococcal glomerulonephritis in sporadic cases from Londrina, PR*

A study was made of forty-eight patients (from three hospitals in Londrina, PR) with acute post-streptococcal glomerulonephritis. In order to complete the epidemiological investigation, thirty eight members of their families were also investigated. A streptococcal pyoderma infection (mainly impetigo) preceded the onset of nephritis and was present in 75% of the patients and in 86.8% of the family groups. In 14.6% of the patients and 36.8% of their relatives there was streptococcal infection of the upper respiratory tract. The HPTH broth an the special culture conditions, for group A streptococci isolation, revealed an unusual finding, of 100% positivity among patients not medicated with antibiotics, before the collection of material for culture, and after the manifestation of nephritis. The most frequent type of group A streptococci was T14(49) (24.3%), followed by types of the complex T1/3/13/B3264 (19.5%), type T12 (15.4%) and T Imp 19 (11.3%), all previously considered nephritogenic. Besides other nephritogenic types isolated, two new combinations of previously known antigenic factors were found in this investigation: T2/28 and T2/4. The same type of group A streptococci was found among untreated patients and their families in 85.7%, and 70.5% of nephritogenic types in family groups of treated patients. These tests were made simultaneously.

\* Síntese do trabalho de tese de Doutoramento de Arléte Scrassolo Martini, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

\*\* Departamento de Ciências Bio-Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara UNESP, 14800 Araraquara, SP.

\*\*\*Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto — USP, 14100 Ribeirão Preto, SP.

\*\*\*\* Departamento de Física e Química da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto — USP, 14100 Ribeirão Preto, SP.

## Introdução

A glomerulonefrite difusa aguda (GNDA) pós-estreptocócica apresenta grande variabilidade de manifestações clínicas. Entre nós há escassos dados sobre o problema, motivo que nos levou a empreender este estudo, que diz respeito à cidade de Londrina, PR, onde a moléstia ocorre na forma endêmica.\*

A ocorrência da nefrite precedida por infecção estreptocócica das vias aéreas superiores (VAS) é conhecida desde 1907 (5), mas só recentemente, nas duas últimas décadas, os investigadores se têm preocupado com as estreptococcus da pele (3, 25, 28). Embora outras bactérias, vírus e diferentes condições patológicas possam causar a GNDA (1, 4, 8, 20), a maior incidência vem consequente a uma infecção estreptocócica (10, 20, 22).

Os estreptococos Beta hemolíticos do grupo A podem ser identificados através da tipagem de dois de seus componentes: as proteínas M e T. A primeira determina a tipo-especificidade do estreptococo e tem grande significado na virulência, na resistência à fagocitose e na imunidade, enquanto a proteína T tem máxima importância epidemiológica na identificação, aquisição e transmissão dos estreptococos do grupo A, entre populações sob condições endêmicas e/ou epidêmicas (30), sendo esta última aplicada por nós.

Há tabelas de correspondência entre os tipos M e T, possibilitando comparação de achados das amostras isoladas (16).

A maioria dos casos de GNDA, pós-estreptococcus de VAS, tem como agente etiológico o tipo M12, seguido dos tipos M4 e M25 dos estreptococos Beta hemolíticos do grupo A (18), enquanto na pós-piodermite, têm sido freqüentes os tipos M49, M52, M53, M54, M55, M57, entre outros (9, 13, 25).

Nosso objetivo foi verificar o grau de associação da piodermite e/ou processo infeccioso das vias aéreas superiores (VAS) com a GNDA, bem como a verificação do grau de positividade para estreptococos Beta hemolíticos do grupo A nos portadores de GNDA e pessoas de suas famílias. Secundariamente, foram pesquisadas a predominância de determinado tipo nefritogênico na região estudada, a simultaneidade de tipos entre pacientes e grupos de família respectivos e a ocorrência simultânea

do mesmo sorótipo em diferentes locais anatômicos (orofaringe, câmara nasal anterior, e lesão de pele) em um mesmo indivíduo.

## Material e Métodos

Nosso material primário foi representado por 48 indivíduos com diagnóstico clínico de GNDA, internados em três hospitais da cidade de Londrina, PR, no período compreendido entre agosto de 1972 e março de 1974.

Desses pacientes, 41 tinham menos de 15 anos de idade e os outros sete, respectivamente, 16, 17 (2), 25, 29, 31 e 44 anos.

Através desse material primário alcançamos os respectivos grupos familiais, em número de 38, que somaram 187 pessoas.

Dos casos examinados, 31 eram leucodermas, 15 melanodermas e dois xantodermas. A amostra correspondia a 50% de cada sexo.

O diagnóstico clínico de GNDA foi feito através de sinais e sintomas-edema, hipertensão, alterações urinárias e resultados de exames laboratoriais — proteinúria, hematúria, cilindrúria, dosagens séricas de anti-estreptolisina O e teor de complemento.

Dos 48 pacientes, 24 haviam tomado uma ou mais doses de antibiótico. Consideramos como antibioticoterapia recente aquela que precedeu de 18 horas ou menos a coleta de material para cultura, e antibioticoterapia remota, aquela superior a 18 horas em relação à coleta.

A pesquisa sobre os grupos de famílias foi feita dentro de duas semanas, a contar do diagnóstico de GNDA no paciente. Os 38 grupos pesquisados corresponderam a 40 pacientes; não foram localizadas as famílias de oito pacientes.

Para a pesquisa bacteriológica foi colhida secreção da orofaringe, câmara nasal anterior, material de lesão de pele, quando presente a piodermite, e de secreção ocular, em um dos pacientes com conjuntivite. O procedimento de coleta foi o mesmo para pacientes e coabitantes.

Foi utilizado o meio de HPTH — Hitchens-Pike-Todd-Hewitt (23), que também serviu como meio de transporte (24). A recuperação das culturas de estreptococos Beta hemolíticos foi feita com transferência para caldo Todd-Hewitt (23) para classificação antigênica.

\* Informação obtida pelos clínicos do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, PR, Junho de 1972.

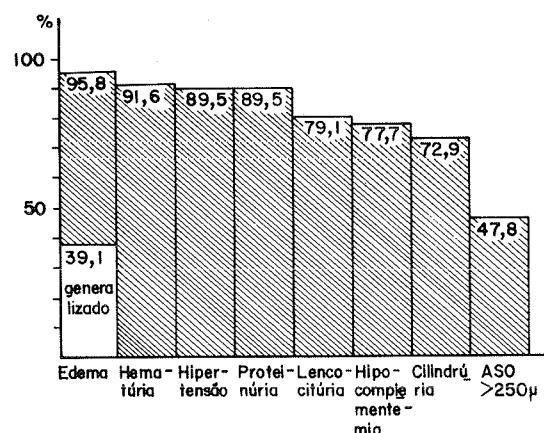
A grupagem foi realizada pelo processo de Maxted (12) para extração do polissacáride C do estreptococo e posterior reação com soros precipitantes dos grupos A, C e G de Lancefield.

Foi utilizado o método de aglutinação de Griffith, modificado por Moody & col. (15), para a tipagem da proteína T dos estreptococos do grupo A.

## Resultados

**Pacientes** — Foram analisados, em percentuais (Figura 1), os dados clínicos e laboratoriais dos 48 pacientes com GNDA, onde podemos observar as alterações daqueles, na maioria dos pacientes.

Figura 1 — Alterações, em percentuais, dos dados clínicos e laboratoriais dos 48 casos de GNDA estudados

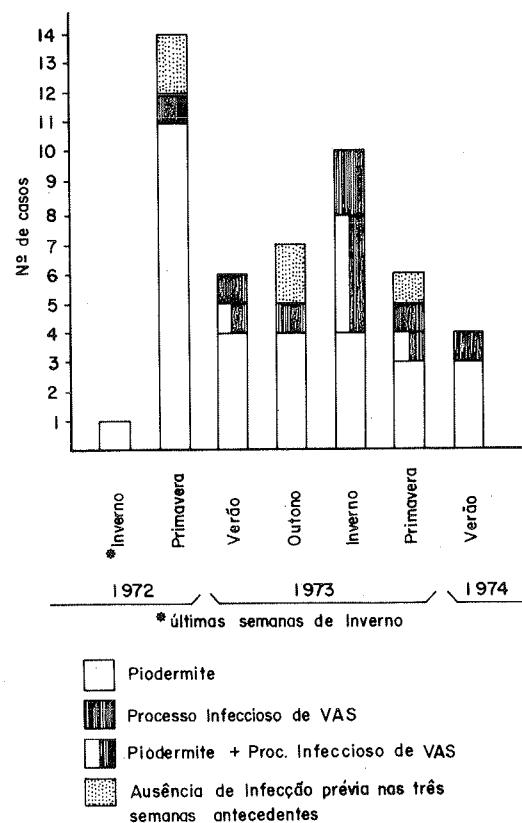


Quanto ao processo infeccioso, foram observados 36 (75%) casos de piôdermite, sendo, grande parte, casos de impetigo, entre os quais, alguns com história de escabiose. Dos pacientes estudados, sete (14,6%) apresentaram somente infecção das vias aéreas superiores, como infecção prévia à nefrite, enquanto houve concomitância dos dois processos, em nove (18,7%) e ausência de processo infeccioso em cinco (10,4%), nas três semanas anteriores à coleta de material para cultura.

Na Figura 2 podemos também verificar a ocorrência do antecedente infeccioso da doença renal, nos períodos sazonais estudados.

Os casos de infecção de VAS, entre os pacientes com GNDA estudados, foram mais freqüentes no inverno de 1973, enquanto a piôdermite, predominante em todas as esta-

Figura 2 — Distribuição sazonal do número de casos de GNDA, notificados, da região de Londrina, relacionada com a infecção prévia, no período entre agosto de 1972 e março de 1974



ções sazonais, teve seu clímax de freqüência na primavera de 1972.

Entre os 24 (50%) pacientes estudados que não tomaram antibiótico, antes da coleta de material para cultura, houve 100% de positividade para estreptococo Beta hemolítico do grupo A. A tipagem da proteína T deste permitiu a verificação da maior freqüência do soro-típico T14(49) (19,4%), seguido do tipo T12 e tipos do "pool" T1/3/13/B3264 (Tabela 1).

Na Tabela 1, além da freqüência dos tipos encontrados, podemos observar qual a fonte de isolamento da amostra. Entre as 35 amostras de estreptococos Beta hemolítico do grupo A, isoladas dos pacientes com GNDA, 22 foram de material de pele.

**Grupos familiais** — Entre as 187 pessoas constituintes dos grupos familiais estudados, 102 (64,2%) tiveram piôdermite nas três últimas semanas, sendo que 55 (29,4%) apresentavam piôdermite em atividade. Destas, 41 (74,5%) eram menores com até 15 anos e apenas 14 (25,4%) tinham idade superior a 15 anos.

**Tabela 1** — Tipos de estreptococos Beta hemolíticos do grupo A, isolados de pacientes com GNDA e número de casos quanto ao sítio anatômico de isolamento

T Tipos isolados	Fonte de isolamento			Total
	Pele	Garganta	Nariz	
14(49)	3	3	1	7
12	3	1	1	5
3/13/B3264*	4	0	0	4
3	1	0	0	1
6	1	1	1	3
Imp 19	3	0	0	3
55	1	1	0	2
23	0	2	0	2
15/17/23/47/19	1	0	0	1
28	0	1	0	1
2/28	1	0	0	1
NT*	3	1	1	5
Total de amostras isoladas	22	9	4	35**

\* Amostra de cada um desses tipos, isolada de pacientes com antibioticoterapia remota

\*\* Esse total é acrescido de uma única amostra NT, isolada de secreção ocular de um dos pacientes, somando portanto 36 amostras isoladas de estreptococo do grupo A

Legenda: NT = Não tipável                    Imp = Impetigo

Em 33 (86,8%) grupos familiais, a piodesmite esteve presente em um ou mais elementos de cada grupo; em 14 (36,8%) grupos, houve ocorrência de infecção de VAS.

Foi considerado como grupo familiar positivo aquele em que foi isolado estreptococo do grupo A, em pelo menos um de seus membros. Tivemos assim 35 (92,1%) grupos positivos e, entre as 183 pessoas sem antibioticoterapia, na ocasião da coleta de material para cultura, foram isoladas 87 amostras (47,5%) de estreptococo do grupo A.

Pela tipagem da proteína T das amostras de estreptococo Beta hemolítico do grupo A, dos diversos materiais biológicos, dos coabitantes dos 38 grupos familiais investigados, verificou-se maior freqüência do sorótipo T14(49), seguido dos sorótipos do "pool" T1/3/13/B3264, do T12 e T Imp 19.

*Relação dos resultados obtidos entre os pacientes e respectivos grupos familiais* — Comparando-se os resultados obtidos entre os pacientes com GNDA e seus respectivos grupos familiais, foram verificados os T tipos de estreptococos do grupo A encontrados no período estudado (Tabela 2), ressaltando-se que os tipos encontrados nos pacientes o foram também nos grupos de família, na mesma ordem de freqüência.

A distribuição dos tipos mais freqüentes, com relação às estações sazonais (Figura 3), permitiu a verificação da predominância ou ausência de determinado tipo de estreptococo nos períodos estudados.

Verificamos predominância de tipos do padrão T1/3/13/B3264 na primavera de 1972 e inverno de 1973; predominância do tipo T14(49) no verão de 1973 e verão de 1974; que o tipo T12 teve um pico maior no outono de 1973 em todo o período estudado e, que o tipo T Imp 19 teve sua prevalência na primavera de 1972.

Procuramos demonstrar a ocorrência de um determinado tipo de estreptococo no grupo familiar (Tabela 3), a fim de detectarmos a simultaneidade de achado do mesmo sorótipo no paciente não medicado e grupo familiar respectivo. Essa ocorrência foi de 85,7% (em 21 dos 38 grupos).

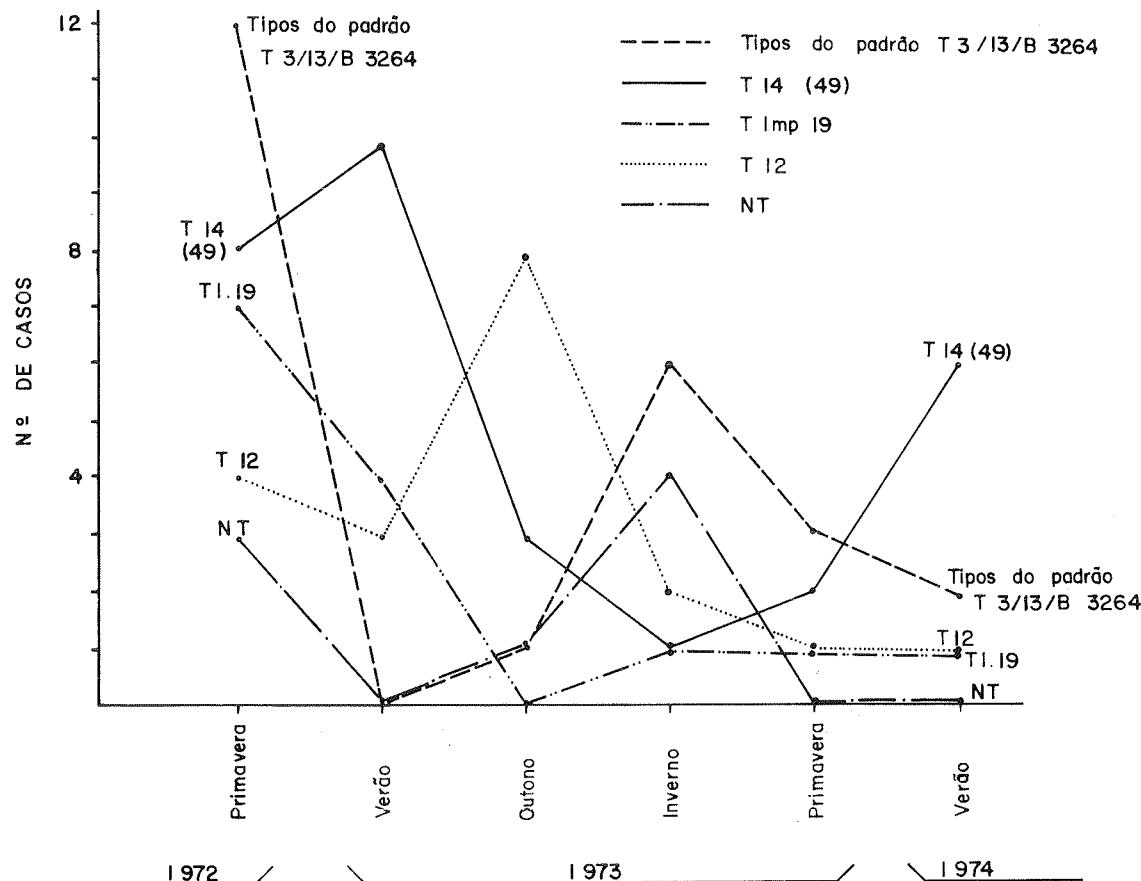
Devido à impossibilidade do isolamento de estreptococo Beta hemolítico dos pacientes tratados com antibiótico, antes da coleta de material para cultura, procuramos relacionar os tipos encontrados em cada elemento de seus grupos familiais, a fim de surpreendermos os tipos nefritogênicos ainda prevalentes na unidade epidemiológica familiar. Temos assim, na Tabela 4, essa relação e verificamos que, em

**Tabela 2** — Número de pacientes notificados com GNDA e membros dos grupos familiais relacionados com os T tipos de estreptococos isolados no período de 8/72 a 3/74 na região de Londrina

Estreptococo T tipo	Pacientes	Membros familiais	Total
14 (49)	7	23	30
3	1	9	10
3/13/B3264	4	4	8
1/3/13/B3264	0	2	2
13	0	2	2
13/B3264	0	1	1
3/13	0	1	1
12	5	14	19
Imp 19	3	11	14
23	2	4	6
55	2	2	4
6	3	1	4
28	1	3	4
15/17/23/47/19	1	2	3
2	0	3	3
2/4	0	2	2
2/28	1	0	1
NT	6	3	9
Total	36	87	123

Legenda: Imp = Impetigo  
NT = Não tipável

**Figura 3** — Distribuição dos quatro T tipos mais frequentes e amostras NT de estreptococos do grupo A, quanto às estações sazonais, na população e período estudados



**Tabela 3** — Simultaneidade de achado do mesmo sorótipo de estreptococo do grupo A no paciente não medicado e respectivo grupo familiar

Caso n.º	T Tipo isolado		$\phi$
	Paciente	Família	
1	14(49)	14(49)	1/6
1a	15/17/23/47/19,6	15/17/23/47/19	1/1
8*	3/13/B3264	3/13/B3264, 13	1/8
19	14(49)	14(49)	1/3
23	Imp 19	3,13, Imp 19	1/8
50	NT	NT	1/6
60	28, 2/28	14(49), 28	2/5
64	Imp 19	Imp 19	1/5
70	Imp 19	Imp 19, 14(49), 3/13	2/8
81	12	12	1/3
85	14(49)	14(49)	4/7
96**	12 (M 12)	12, Imp 19	1/7
97**	12, 14(49)	12, Imp 19	1/7
106	55 M55	55 M55, 14(49)	1/8
117	14(49)	14(49), Imp 19	1/3
121	23, 3	23,2	1/4
239	NT	NT	1/3
244	14(49)	14(49)	1/2
263	14(49)	14(49), 2/4, 23	4/13
143	23	14(49)	0/6
277	12	3/13/B3264	0/6
224	6	28	0/4

$\phi$  = Relação entre o número de pessoas do grupo familiar que têm o mesmo sorótipo do paciente e número de membros desse grupo

\* Pacientes com antibioticoterapia remota

\*\* Irmãos consangüíneos

**Tabela 4** — Relação dos T tipos de estreptococos do grupo A isolados e proporção de pessoas do grupo familiar de pacientes com medicação antibiótica

Caso n.º	T tipo isolado do grupo familiar	$\phi$
38	12 (M 12)	1/5
57	—	0/2
128	2	1/5
135	—	0/6
142	12	4/8
170	12, NT, 14(49), 2/4	3/4
177	12	1/1
179	1/3/13/B3264, 14(49)	3/6
202	2,3/13/B3264	2/4
203	3	3/7
218	23	0/2
232	12, Imp 19	1/5*
248	Imp 19	1/2
256	—	0/2
259	12	1/2
286	14(49), 13/B3264	2/3
292	Imp 19, 6	2/2

$\phi$  = Relação entre o número de pessoas do grupo familiar com estreptococo nefritogênico e número de elementos desse grupo

\* Dois tipos nefritogênicos isolados de locais anatômicos diferentes, em um mesmo paciente

82,3% desses grupos, foram isolados estreptococos nefritogênicos.

Dos 38 grupos familiais investigados, 29 (76,3%) foram positivos e apenas nove (23,7%) foram considerados negativos para estreptococos nefritogênicos.

Entre os 48 casos de GNDA estudados, oito pacientes não tiveram seus grupos familiais investigados e em quatro deles foram isolados estreptococos do grupo A. Nos quatro restantes, não se isolou a bactéria, pois todos eles haviam tomado antibiótico.

## Discussão

Os achados clínicos e laboratoriais dos pacientes com GNDA foram consistentes com o quadro característico da doença, ressaltando-se que todos eram casos internados (Fig. 1).

O processo infeccioso mais comum como determinante da GNDA foi a piôdermite, em 75% dos pacientes. Nos 25% (12 casos) restantes, embora não houvessem apresentado piôdermite nas três semanas anteriores ao diagnóstico de GNDA, as informações obtidas não permitem afirmar sobre a presença ou ausência de piôdermite anterior.

O impetigo foi a forma de piôdermite mais comum do processo infeccioso. Wannamaker (29) e Martini (11) fazem amplas considerações sobre a importância da piôdermite no aparecimento da seqüela em estudo.

Quanto à distribuição sazonal dos casos notificados de GNDA, com relação à infecção prévia, no período estudado, verifica-se, pela Figura 2, o pico correspondente a 14 casos na primavera de 1972, com 11 antecedentes de piôdermite\*. No inverno de 1973, há outro pico, com 10 casos de GNDA, sendo que, em dois destes, o antecedente foi somente de VAS; em quatro, houve somente piôdermite e, nos quatro restantes, houve concomitância do processo infeccioso. Portanto, de apenas um antecedente de VAS na primavera, houve seis casos de VAS no inverno, em concordância com os conceitos definidos e citados por Martini (11).

Em nossa opinião, o meio de cultura empregado e as condições de cultivo são responsáveis pelos altos índices de positividade encontrados por Martini (11) e por Toporovski (27),

sendo dos mais elevados em estudos desse gênero.

Entre os 24 pacientes não medicados com antibióticos, antes da coleta de material para cultura, foram isolados 34 amostras, indicando alto índice de contaminação, abrigando, esses pacientes, estreptococo do grupo A, em mais de um local anatômico pesquisado, isto é, 17 amostras de pele; 12 em material de orofaringe; quatro em material de câmara nasal anterior e uma amostra de secreção ocular.

Em quatro pacientes, todos com piôdermite, houve concomitância do mesmo sorótipo nos vários sítios anatômicos pesquisados, achados estes consistentes com os de Ferrieri & col. (7), quanto ao "ciclo migratório" do estreptococo.

Tivemos 93,6% de tipabilidade em 36 amostras de estreptococo do grupo A, isoladas dos diferentes materiais colhidos de 24 pacientes não medicados e dois medicados, pelo método de aglutinação da proteína T, resultado compatível com os de Parker (16). Verifica-se, na Tabela 1, que o tipo T14 (49) foi o mais frequente entre os pacientes com GNDA, seguido dos tipos T12, e tipos do "pool" T1/3/13/B3264. Deve-se salientar que utilizamos um soro T, que permite a detecção dos tipos 14 e 49, embora haja, atualmente, outro soro T, especialmente preparado para aglutinar o tipo específico T49 (= M49).

O tipo T14 (49) é de vasta distribuição geográfica, tendo sido isolado de casos de GNDA seguidos à infecção de VAS (29) e principalmente à piôdermite (13), em várias partes do mundo.

O tipo T12 M12 é sorótipo clássico, associado com nefrite aguda após faringite ou amigdalite (28, 29), nos EUA, Canadá, Austrália, Inglaterra, Chile, Japão, Holanda, Nova Escócia, Trinidad, Suécia e Brasil e também isolado de pele, como citado por Martini (11), Dillon & col. (6) e Anthony & col. (2), entre outros.

Entre as amostras do padrão T1/3/13/B3264 isoladas, quatro foram tipo T3/13/B3264, sendo que esse tipo nefritogênico de pele já havia sido isolado no Brasil (19, 27) e nos EUA (6). O tipo T3, considerado amostra epidêmica, é também nefritogênica (5, 31).

Além desses tipos mais freqüentes, outros, também de pele, foram isolados por nós.

• O tipo T Imp 19, nefritogênico (6), pertence

\* O levantamento para este trabalho teve início nas últimas semanas do inverno de 1972, razão pela qual só tivemos um caso notificado de GNDA nesse período.

ao padrão T 8/25/ Imp 19 e já foi isolado em Israel, Trinidad, nos EUA e no Brasil (27), sendo classificado com + + + de positividade e como nefritogênico de pele.

- O tipo T6, que encontramos, é considerado nefritogênico (5) e freqüente em portadores sadios, no Japão (14).
- O tipo M55 foi inicialmente isolado em Trinidad e posteriormente em pacientes com GNDA, no Egito, Singapura, África do Sul e Venezuela (17). O tipo de combinação por nós encontrado, T55 M55, não foi encontrado na literatura revisada, foi isolado de pele e garganta de um único paciente.
- O tipo T23 encontrado pertence ao padrão T15/17/23/47/19 e está associado com lesões de pele (2).
- Quanto ao tipo T28, que freqüentemente é também T56 e M56, é isolado de pele, em casos de nefrite, em outras áreas do mundo (26).
- O tipo T2/28 isolado de pele de um paciente, foi o único organismo obtido nesse indivíduo na ocasião. Considerando-se que o T28 possa ser nefritogênico, essa amostra poderia ser nova combinação de tipo nefritogênico.

Com relação aos grupos familiais, alguns investigadores têm sugerido que certas unidades familiais possam ser mais susceptíveis à aquisição do estreptococo e da doença estreptocócica (32), constituindo o foco primário da manutenção e propagação do microrganismo, dentro da comunidade. Porém, a introdução do estreptococo dentro da unidade familiar é feita freqüentemente por uma criança na idade escolar (32).

Zimmerman & Wilson (32) observaram, além do alto percentual de 97,5% de introduções do estreptococo na família, por crianças na idade escolar, que as famílias portadoras mostraram maior susceptibilidade para a aquisição e propagação intrafamiliar do que as famílias não portadoras. Nossa observação que, em três (7,8%) dos grupos familiais estudados, ocorreu mais de um caso de nefrite, evidenciam o contágio intrafamiliar.

As condições higiênicas dos grupos familiais investigados, residindo em um ou dois cômodos, aglomerados e sem condições sanitárias adequadas, com infreqüência de banhos e a ocorrência de casos de escabiose, que se tornam impetiginosos, facilitaram a propagação e manutenção dos estreptococos de pele, dentro de cada grupo familiar.

Embora o ambiente tenha grande influência

na propagação da infecção estreptocócica, o maior problema é o próprio homem, que é um reservatório do agente infeccioso, já que a transmissão ocorre de pessoa a pessoa.

Os tipos mais freqüentes de estreptococos isolados entre os pacientes foram também isolados entre os constituintes dos grupos familiais, resultados consistentes com a epidemiologia do estreptococo do grupo A, cuja unidade epidemiológica fundamental é o grupo familiar.

O tipo T2 foi isolado de uma lesão de pele em três indivíduos com piôdermite, sendo este tipo, T2 M2, relacionado com nefrite por Rodrigues (21). O tipo T2/4 foi por nós isolado de indivíduos com piôdermite, de material de lesão de pele de um deles e de orofaringe, no outro, sendo combinação não citada na literatura consultada.

Na Tabela 2, podemos verificar que os T tipos de estreptococos do Grupo A, isolados dos pacientes e respectivos grupos familiais foram o T14 (49), seguido dos tipos do padrão T1/3/13/B3264, T12 e T Imp 19, todos considerados nefritogênicos, sendo o T14 (49), nefritogênico com + + + de positividade (29).

Quanto à distribuição sazonal dos T tipos mais freqüentes isolados dos pacientes e grupos familiais, observamos, na Figura 3, os vários picos daqueles e também, que cada tipo tem sua evolução que lhe é própria, independente dos demais.

Estudo semelhante da freqüência de tipos de estreptococos encontrados em um quinquênio, na cidade de Ribeirão Preto — SP, foi feito por Solé-Vernin & Moody (24).

O achado de 85,7% de simultaneidade do mesmo sorótipo entre paciente e grupo familiar investigado é bastante elevado e evidencia indubitavelmente o contágio intrafamiliar.

Devido à impossibilidade de achado simultâneo do mesmo sorótipo entre os pacientes medicados e seus grupos familiais (Tabela 4), um achado muito importante foi o do alto percentual (70,5%) desses grupos com amostras consideradas nefritogênicas. Essa informação pode fornecer elementos para considerar que o mesmo tipo encontrado no grupo pudesse ser o agente etiológico da GNDA no paciente, considerando-se ainda os conceitos já firmados sobre as condições habitacionais, como aglomeração, condições sanitárias adequadas, casos de escabiose etc. Entre os grupos dos quais não se isolou estreptococo grupo A nefritogênico está o do caso nº 135, cujos membros também haviam tomado antibiótico.

O tipo T14 (49), embora tenha sido o mais freqüente, não teve predominância absoluta, uma vez que foi encontrada grande variedade de T tipos. Estes poderiam estar relacionados com as características de desenvolvimento da região que, em curto espaço de tempo, recebeu imigrantes de várias regiões do globo.

Considerando em conjunto, os resultados obtidos, podemos concluir:

1º) Ficou constatada uma maior associação da piodermitite como determinante da GNDA do que o processo infeccioso das vias aéreas superiores, nos pacientes estudados na região de Londrina, no período entre agosto de 1972 e março de 1974.

2º) A positividade de 100% para estreptococos Beta hemolíticos do grupo A nos pacientes não medicados constitui fato incomum na literatura, certamente pela utilização de condições muito adequadas de cultura, quando se visa ao isolamento a partir de pequeno número de bactérias (meio de cultura utilizado: HPTH).

3º) A tipagem de 93,6% de amostras do grupo A, pela proteína T, permitiu a verificação da predominância do sorótipo T14 (49) (24,3%) entre os pacientes e grupos de família estudados, no período em investigação.

4º) Outros tipos nefritogênicos foram também isolados com freqüência, a saber: tipos do complexo T3/13/B3264 (19,5%), T12 (15,4%) e T Imp 19 (11,3%) e os tipos T55 M55, T6, T28, em menor proporção.

5º) Foram encontradas, entre os tipos de

estreptococos do grupo A, duas novas combinações de fatores antigênicos já conhecidos: o T2/28 e T2/4.

6º) A ocorrência de 85,7% do mesmo sorótipo, nos pacientes não medicados com antibiótico e respectivos grupos familiais, veio confirmar o conceito de que o grupo familiar é a unidade epidemiológica das estreptococcias.

7º) O achado de 70,5% de grupos familiais com tipo nefritogênico, de cujos pacientes medicados com antibióticos não se isolou estreptococo do grupo A, forneceu-nos elementos para supor que o tipo encontrado em cada grupo pudesse ser o mesmo sorótipo responsável pela GNDA do paciente.

8º) A concomitância do mesmo sorótipo em um mesmo indivíduo (do paciente ou do grupo familiar), nos diferentes sítios anatômicos pesquisados, é consistente com a hipótese do "ciclo migratório" do estreptococo, no material em estudo.

9º) Além do alto percentual de ocorrência do mesmo sorótipo entre pacientes e grupos de famílias, o contágio intrafamiliar foi também observado em nosso estudo, pela ocorrência de mais de um caso de GNDA em 3 das 38 (7,8%) famílias investigadas.

## Agradecimentos

À Sra. Mirandolina T.M. Junqueira, pela colaboração técnica prestada.

## Referências Bibliográficas

- Aguiar, J. A. de — Glomérulonefrite difusa aguda. J. bras. Med., 6:633-651, 1962.
- Anthony, B. F; Perlman, L. V. & Wannamaker, L. W. — Skin infections and acute nephritis in American Indian children. Pediatrics, 39:263-277, 1977.
- Bisno, A. L.; Pearce, I. A.; Wall, H. P.; Moody, M. D. & Stollerman, G. H. — Contrasting epidemiology of acute rheumatic fever and acute glomerulonephritis. New Engl. J. Med., 283:561, 1970.
- Burke, E. C. & Titus, J. L. — Poststreptococcal acute glomerulonephritis in children. Med. Clin N. Am., 50:1141-1158, 1966.
- Dillon Jr., H. C. — Pyoderma and nephritis. A. Rev. Med., 18:207-218, 1967.
- Dillon Jr., H. C.; Moody, M. D.; Maxted, W. R. & Parker, M. T. — The epidemiology of impetigo and acute glomerulonephritis. Results of serological typing of group A streptococci. Am J. Epidemiol., 86:710-723, 1967.
- Ferrieri, P.; Dajani, A. S.; Wannamaker, L. W. & Chapman, S. S. — Natural history of impetigo. I-Site sequence of acquisition and familial patterns of spread of cutaneous streptococci. J. clin. Invest., 51:2851-2862, 1972.
- Fleischman, P. — Diffuse acute glomerulonephritis. Hospital, 71:161-172, 1967.
- Kleinman, H. — Epidemic acute glomerulonephritis at Red Lake, Minn. Med., 37:479-489, 1954.
- Manissadjian, A.; Penha, H. A. de O & Yassuhiko, O. — Glomerulonefrite difusa aguda. In: Alcantara, P. & Marcondes, E. — Pediatria Básica. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo, Sarvier, 1974. v. 1, p. 709.
- Martini, A. S. — Aspectos bacteriológicos e epidemiológicos na glomerulonefrite difusa aguda (pós-streptocócica) de casos esporádicos da região de Londrina — Paraná (1972-1974). São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 1976. 106 p (Tese de Doutoramento).
- Maxted, W. R. — Preparation of streptococcal extracts for Lancefield grouping. Lancet, 14:255-256, 1948.
- Maxted, W. R.; Fraser, C. A. M. & Parker, M. T. — *Streptococcus pyogenes*, type 49. A nephritogenic streptococcus with a wide geographical distribution. Lancet, 1:641-644, 1967.

14. Miyamoto, Y. — Precedings: type distribution of group A Strep in Japan with references to the international type distribution survey. Jap. Circul. J., 39:162-163, 1975.
15. Moody, M. D.; Padula, J.; Lizana, D. & Hall, C. T. — Epidemiologic characterization of group A streptococci by T-agglutination and M-precipitation tests in the public health laboratory. Hlth Lab. Sci., 2:149-162, 1965.
16. Parker, M. T. — Streptococcal skin infection and acute glomerulonephritis. Br. J. Derm., 81 (suppl. 1):37-46, 1969.
17. Potter, E. V.; Ortiz, J. S.; Sharrett, A. R.; Burt, E. G.; Bray, J. P.; Finklea, J. F.; Poon-King, T. & Earle, D. P. — Changing types of nephritogenic streptococci in Trinidad. J. clin. Invest., 50:1197-1205, 1971.
18. Rammelkamp Jr., C. H. & Weaver, R. S. — Acute glomerulonephritis: The significance of variations in the incidence of the disease. J. clin. Invest., 32:345-358, 1953.
19. Rigatto, H.; Nogueira, J. L.; Solé-Vernin, C.; Corrêa, C. E. C.; Dabori, A. & Cicogna, A. C. — Glomérulo nefrite difusa aguda. Estudo de um surto familiar com levantamento epidemiológico. Rev. paul. Med., 73:53-64, 1968.
20. Rocha, R. de S. — Glomérulonefrite (Revisão). J. bras. Med., 21:65-76, 1971.
21. Rodriguez, R. S. — Acute glomerulonephritis and Scarlet fever caused by *Streptococcus pyogenes* Type 2 (M2, T2). J. infect. Dis., 130:315, 1974.
22. Schmidt, W. C. & Rammelkamp Jr., C. H. — Etiology and Pathogenesis of glomerulonephritis. Adv. internal Med., 9:181-191, 1958.
23. Solé-Vernin, C. — *Streptococcus pyogenes* carriers detection: Preservation of original throat specimens and their enrichment. Hospital, 65:105-124, 1964.
24. Solé-Vernin, C. & Moody, M. D. — Beta Hemolytic Streptococci. Grouping and Group A Typing in Ribeirão Preto, SP., Brazil, 1966-1970, Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 15:272-283, 1973.
25. Stollerman, G. H. — Rheumatogenic and Nephritogenic Streptococci. Circulation, 43:915-921, 1971.
26. Svartman, M.; Potter, E. V.; Poon-King, T. & Earle, D. P. — Streptococcal infection of scabetic lesions related to acute glomerulonephritis in Trinidad. J. Lab. Clin. Med., 81:182-193, 1973.
27. Toporovski, J. — Aspectos bacteriológicos e imunológicos da glomerulonefrite difusa aguda (pós-estreptocócica) na infância. São Paulo, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa. 1975. 83p. (Tese de Livre-Docência).
28. Wannamaker, L. W. — Differences between streptococcal infections of the throat and of the skin (First of two parts). New Engl. J. Med., 282:23-31, 1970.
29. Wannamaker, L. W. — Differences between streptococcal infections of the throat and of the skin (Second of two parts). New Engl. J. Med., 282:78-85, 1970.
30. Wilson, E.; Zimmerman, R. A. & Moody, M. D. — Value of T-agglutination typing of group A streptococci in epidemiologic investigations. Hlth Lab. Sci., 5:199-207, 1968.
31. Zimmerman, R. A.; Cross, W. M.; Miller, D. R. & Scipple, G. W. — A streptococcal epidemic in an isolated civilian population with institution of mass prophylaxis. J. Pediat., 69:40-45, 1966.
32. Zimmerman, R. A. & Wilson, E. — Familial susceptibility to acquisition of group A Beta-hemolytic streptococci. Am. J. Dis. Child., 116:292-300, 1968.

## Distinção entre *Yersinia enterocolitica* e de *Yersinia pseudotuberculosis* frente a antibióticos e quimioterápicos\*

D.P. Falcão\*\*  
J.J. Farmer III\*\*\*  
& V.R. Dowell Jr.\*\*\*

### Resumo

Investigando a ação de 12 drogas sobre *Yersinia enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, pela técnica do disco único de Bauer e Kirby, verificou-se que as duas espécies são sensíveis a grande número de antibióticos e quimioterápicos e que essa sensibilidade possibilita uma diferenciação entre *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. As penicilinas e a colistina constituem os antibióticos diferenciadores. Não se observou, com *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, correlação entre origem das amostras e comportamento frente a drogas.

### Summary

*Differentiation between Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis by using antibiotics and chemotherapeutic agents*

After an investigation of the action of 12 drugs on *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* by the single disk technique of Bauer and Kirby, it was observed that the two species of bacteria are sensitive to a great number of antibiotics and chemotherapeutic agents. This sensibility allows the differentiation between *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* with colistin and the penicillins being the differentiating antibiotics. No relationship between the origin of the strains and sensitivity to the drugs was observed among the strains of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*.

### Introdução

A literatura sobre o comportamento de *Yersinia enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* frente a antibióticos e quimioterápicos revela, em certos casos, consideráveis divergências de resultados ou de interpretações. Muitas são devidas à variedade de métodos e detalhes de técnicas utilizadas por diversos autores.

Este fato foi demonstrado em *Y. enterocolitica*, frente a inúmeros antibióticos, por Sonnenwirth (16), com o uso do método de difusão em agar de Bauer-Kirby e da técnica de diluição em tubo.

Entre as drogas testadas, a penicilina é a que dá maior diversidade de resultados quanto à sensibilidade ou resistência, em amostras de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* (1, 3,

4, 6, 7, 10, 15, 17). No caso da benzilpenicilina, Kanazawa & Kuramata (9) relacionaram a resistência à capacidade de síntese da enzima beta-lactamase.

As amostras de *Y. enterocolitica*, além da variedade frente à penicilina, apresentam diferenças de comportamento em relação à estreptomicina e ampicilina (1, 4, 5, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18).

O estudo do comportamento de amostras de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, frente a vários antibióticos e quimioterápicos, objetivou verificar a diferenciação entre as duas espécies bacterianas, através das drogas estudadas, e a existência de relação entre a origem das amostras e sua sensibilidade ou resistência a drogas.

\* 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, UNESP, Araraquara, SP.

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

## Material e Métodos

Foram estudadas 43 amostras de *Y. enterocolitica* e 49 amostras de *Y. pseudotuberculosis*, de origem humana e animal, todas pertencentes a coleção.

Para antibiogramas, foi adotado o método da Difusão em Agar (2), empregando-se discos BBL, com as seguintes drogas: sulfadiazina, ácido nalidíxico, estreptomicina, kanamicina, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, penicilina G, ampicilina, carbenicilina, cefalotina, colistina.

## Resultados e Discussão

Todas as amostras de *Y. enterocolitica* foram sensíveis à sulfadiazina, ácido nalidíxico, estreptomicina, kanamicina, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol e colistina. O comportamento foi variável com relação às penicilinas, sendo que as amostras mostraram-se resistentes, moderadamente sensíveis e sensíveis (Tabela 1).

Quanto a *Y. pseudotuberculosis*, todas as amostras foram sensíveis à sulfadiazina, ácido nalidíxico, estreptomicina, kanamicina, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, penicilina G, ampicilina, carbenicilina e cefalotina. O comportamento foi variável em relação à colistina (Tabela 1).

Não se observou qualquer correlação entre a origem das amostras e o modelo de sensibilidade às drogas testadas.

A análise dos dados observados, comparativamente aos relatados por outros autores, quanto à sensibilidade de *Y. pseudotuberculosis* ao cloranfenicol, ampicilina, cefalotina, estreptomicina, tetraciclina, penicilina e colistina, observamos alguns resultados semelhantes e outros divergentes (1, 9, 10, 11, 15). Não há dados para comparar resultados de sensibilidade

de *Y. pseudotuberculosis*, em relação ao ácido nalidíxico, sulfadiazina, gentamicina e kanamicina.

Comparando os resultados obtidos, quanto ao comportamento de *Y. enterocolitica* aos relatados por outros autores, há concordância quanto à colistina, tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina, ácido nalidíxico, gentamicina, sulfadiazina, ampicilina e cefalotina (1, 4, 5, 8, 12, 13, 14, 16, 17, 18); são concordantes e divergentes aos de alguns autores (1, 4, 5, 7, 8, 15, 17, 18), quanto às penicilinas e estreptomicina; mas não há dados para comparar os resultados apresentados por *Y. enterocolitica* frente à carbenicilina.

Os resultados obtidos mostram que as duas espécies estudadas são sensíveis a grande número de antibióticos e quimioterápicos e que essa sensibilidade possibilita a diferenciação entre *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, pois há relação entre cada uma das espécies e sua sensibilidade aos quimioterápicos e antibióticos. As penicilinas e a colistina constituem os antibióticos diferenciadores.

Todas as amostras de *Y. pseudotuberculosis* mostraram-se sensíveis à penicilina G, ampicilina, carbenicilina e cefalotina, enquanto todas as amostras de *Y. enterocolitica* mostraram-se sensíveis à colistina.

Analisando o comportamento de amostras de *Y. enterocolitica*, tanto as bioquimicamente típicas, como aquelas cuja presença, na espécie, são contestadas, devido a suas características bioquímicas anômalas, bem como de amostras de *Y. pseudotuberculosis*, tentando correlacionar origem das amostras e comportamento frente às drogas, não observamos qualquer correlação. Assim, um critério de caracterização dessas bactérias, que associe origem das amostras à sensibilidade ou resistência às drogas, não se mostrou eficiente.

**Tabela 1** — Comportamento de 43 amostras de *Y. enterocolitica* e 49 amostras de *Y. pseudotuberculosis* frente às penicilinas e colistina

Drogas	Resistente		Intermediário		Sensível	
	Y. entero. nº	Y. entero. %	Y. pseudo nº	Y. pseudo %	Y. entero. nº	Y. entero. %
Penicilina G	40	93,0	0	—	3	6,97
Ampicilina	13	30,23	0	—	8	18,6
Carbenicilina	27	62,79	0	—	1	2,32
Cefalotina	28	65,11	0	—	5	11,62
Colistina	0	—	33	76,74	0	—
					1	2,04
					0	—
					15	30,61

Y. entero = *Yersinia enterocolitica*

Y. pseudo = *Yersinia pseudotuberculosis*

## Referências Bibliográficas

1. Ahvonnen, P. — Human Yersiniosis in Finland. I — Bacteriology and Serology. Ann. Clin. Res., 4:30-38, 1972.
2. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Path., 45:493-496, 1966.
3. Borowski, J. & Zeremba, M. — Some problems connected with *Yersinia pseudotuberculosis* resistance to antibiotics. In: International Symposium on *Yersinia, Pasteurella and Francisella*, Malmo, Apr. 10-12, 1972. Proceedings. Basel, S. Karger, 1973, p. 196-202.
4. Frederiksen, W. — A study of some *Yersinia pseudotuberculosis* like bacteria. Scandinavian Congress on Pathology and Microbiology, 14º, Oslo, 1964. Proceedings, p. 103-104.
5. Germain, P.; Rigaud, C.; Rémy, G.; Strady, A.; Leutenegger, M. & Dalle, M. — Septicémies à *Yersinia enterocolitica*. Deux observations. Annls, Méd. int., 125:667-674, 1974.
6. Hagen, A.G.; Lassen, J. & Berge, L.N. — Erysipelas-like disease caused by *Yersinia enterocolitica*. Scand. J. Infect. Dis., 6:101-102, 1974.
7. Hausnerová, S.; Hausner, O. & Pauckova, V. — Antibiotic sensitivity of *Yersinia enterocolitica* strains isolated in two regions of Czechoslovakia. In: International Symposium on *Yersinia, Pasteurella and Francisella*, Malmo, Apr. 10-12, 1972. Proceedings, Basel, S. Karger, 1973, p. 76-80.
8. Kanazawa, Y.; Ikemura, K.; Sasagawa, I. & Shigeno, N. — A case of terminal eleitis due to *Yersinia pseudotuberculosis*. J. Jap. Ass. Infect. Dis., 48:220-228, 1974.
9. Kanazawa, Y. & Kuramata, T. — Difference in susceptibility to benzylpenicillin between *Yersinia enter-*
- colitica
10. colitica
- and *Yersinia pseudotuberculosis*. Jap. J. Microbiol., 18:483-485, 1974.
11. Mair, N.S.; Mair, H.J.; Stirke, E.M. & Corson, J.G. — Three cases of acute mesenteric lymphadenitis due to *Pasteurella pseudotuberculosis*. J. clin. Path., 13:432-439, 1960.
12. Mollaret, H.H. — Pasteurellose et Yersinioses. Gaz. Méd. Fr., 1:3633-44, 1966.
13. Mollaret, H.H.; Omland, T.; Henriksen, S.D.; Baeroe, P.R.; Rykner, G. & Scavizzi, M. — Les septicémies humaines à *Yersinia enterocolitica*. A propos de dix-sept cas récents. Presse Med., 79:345-348, 1971.
14. Niléhn, B. — Studies on *Yersinia enterocolitica*. Characterization of 28 strains from human and animal sources. Acta. path. microbiol. scand., 69:83-91, 1967.
15. Rabson, A.R.; Hallet, A.F. & Koornhof, H.J. — Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. J. Infect. Dis., 131:447-451, 1975.
16. Smith, J.E. & Thal, E. — Taxonomic study of the genus *Pasteurella* using a numerical technique. Act. path. microbiol. scand., 64:213-223, 1965.
17. Sonnenwirth, A.C. — Bacteremia with and without meningitis due to *Yersinia enterocolitica*, *Edwardsiella tarda*, *Commonas terrigena*, and *Pseudomonas maltophilia*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 174:488-502, 1970.
18. Winblad, S.; Niléhn, B. & Jonsson, M. — Two further cases, bacteriologically verified, of human infection with *Pasteurella "X"* (Syn. *Yersinia enterocolitica*). Acta path. microbiol. scand., 67:537-541, 1966.
19. Zen-Yoji, H. & Maruyama, T. — The first successful isolation and identification of *Yersinia enterocolitica* from human cases in Japan. Jap. J. Microbiol., 16:493-500, 1972.

**Opportunist mycobacteria isolated  
from the mesenteric lymph nodes  
of apparently healthy pigs  
in São Paulo, Brazil**

A.F. Pestana de Castro\*  
O. Campedelli Filho\*\*  
& E. Waisbich\*\*\*

**Summary**

Mesenteric lymph nodes of 500 apparently healthy pigs were examined bacteriologically for the isolation of mycobacteria. Ninety five strains were isolated and classified as follows: *M. gordonaë* (2 strains), *M. flavescentis* (2 strains), MAIS complex (74 strains), *M. terrae* complex (14 strains), and *M. fortuitum* (3 strains). These isolates were studied according to their biochemical, cultural and serological properties. Studies on drug resistance and histopathological examinations of positive lymph nodes were also carried out. Except pigment and peroxidase production by some strains of the MAIS complex the remaining biochemical tests provided results similar to those reported by other authors. The MAIS complex isolates belonged to serotypes 1, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15 and 41 with nitid predominance for serotypes 6 (18 strains) and 8 (19 strains) followed by serotype 7 (10 strains), representing 48,46% of them all. Drug resistance tests revealed that the general behavior of MAIS complex strains in relation to tuberculostatic drugs was more or less homogeneous. All isolates of this group were resistant to PAS and isoniazid. Resistance to ethionamide, ethambutol, rifampicin, thiosemicarbazone, capreomycin, kanamycin and viomycin showed variable results. Strains belonging to *M. terrae* complex were more sensitive to streptomycin than MAIS complex microorganisms. In the histopathological examinations it was verified that strains classified as MAIS complex (serotype *intracellulare*), *M. flavescentis* and *M. fortuitum* may be found in the mesenteric lymph nodes of apparently healthy pigs without causing any lesion similar to those present in classical tuberculosis.

**Resumo**

*Micobactérias oportunistas isoladas de nódulos linfáticos mesentéricos de suínos aparentemente normais em São Paulo, Brasil*

Nódulos linfáticos mesentéricos de 500 suínos aparentemente normais foram examinados bacteriologicamente para o isolamento de micobactérias. Noventa e cinco amostras foram isoladas e classificadas como: *M. gordonaë* (duas amostras), *M. flavescentis* (duas amostras), complexo MAIS (74 amostras), complexo *M. terrae* (14 amostras) e *M. fortuitum* (três amostras). Estas amostras foram estudadas de acordo com suas propriedades bioquímicas, culturais e sorológicas, tendo também sido feitos estudos sobre resistência a drogas e exames histopatológicos. Exceção feita a produção de pigmento e peroxidase por algumas amostras do complexo MAIS, os testes bioquímicos restantes forneceram resultados semelhantes aos descritos por outros autores. As amostras do complexo MAIS pertencem ao sorotipos 1, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15 e 41 com nítida predominância para os sorotipos 6 (18 amostras) e 8 (19 amostras), seguido pelo sorotipo 7 (10 amostras) perfazendo estes três últimos sorotipos 48,46% do total. Os testes para resistência a drogas revelaram que o comportamento das amostras do complexo MAIS, em relação às drogas tuberculostáticas, foi mais ou menos homogêneo. Todas as amostras deste grupo foram resistentes ao PAS e isoniazida. Os testes para resistência a etionamida, etambutol, rifampicina, tiosemicarbazona, capreomicina, kanamicina e viomicina mostraram resultados variáveis. Amostras pertencentes ao complexo *M. terrae* foram mais sensíveis a estreptomicina do que microrganismos do complexo MAIS. Nos exames histopatológicos foi verificado que amostras do complexo MAIS (sorotipo *intracellulare*), *M. flavescentis* e *M. fortuitum* podem ser encontrados nos gânglios linfáticos mesentéricos de suínos, aparentemente normais, sem causar nenhuma lesão semelhante àquelas presentes na tuberculose clássica.

\* Department of Microbiology and Immunology University of Campinas. 13.100 Campinas, SP, Brazil.

\*\* Biological Institute, São Paulo, SP, Brazil.

\*\*\* Biosciences Institute — University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

## Introduction

The importance of opportunist mycobacteria has increased in the last years because of the correlation which has been established between these microorganisms and tuberculosis — like disease in animals and human beings (5, 8, 16, 20, 26, 27, 28).

On account of the increasing significance of the opportunist mycobacteria for domestic animals and considering that as far as Brazil is concerned many studies in this field were still required we decided to investigate the presence of these microorganisms among pigs. For this purpose, mesenteric lymph nodes of apparently healthy pigs were examined bacteriologically for acid-fast bacilli. The mycobacteria isolated were then studied biochemically and when recommended serologically. Complementary studies on drug resistance and histopathology were also carried out in order to help the classification of the microorganisms and to evaluate their importance in veterinary and public health.

## Material and Methods

**Strains** — For the isolation of opportunist mycobacteria, 500 mesenteric lymph nodes of apparently healthy slaughtered pigs, from regions of São Paulo and Paraná, Brazil, were examined bacteriologically for the presence of acid-fast bacilli.

A mesenteric lymph node was collected from each slaughtered animal. A fragment was kept in 10% of formaldehyde for histopathological examination. The remainder portion was then dipped in boiling water for approximately five seconds being afterwards ground with sterile fine sand in a mortar. After that, enough saline was added in order to make a 10% suspension which was subsequently treated by Petroff's technique and inoculated in Loewenstein-Jensen, Stonebrinks and Sula media which were then incubated as recommended previously<sup>4</sup>.

Ninety-five strains of mycobacteria were isolated by this procedure representing 19% of isolations among 500 materials examined between August 1973 and September 1974. The isolates were next kept on Loewenstein-Jensen medium and subcultured each three months. All strains isolated by us were designated by the letter S followed by the material number from which isolation was achieved.

**Biochemical and cultural behavior** — Tests for nitrate reduction, catalase production and its inactivation at 68°C, tween 80 hydrolysis, pigment production, arysulfatase and tolerance to 5% of sodium chloride were carried according to the methods recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, Georgia (31).

The rate of growth was measured by culturing diluted inocula (4mg of bacilli per ml of saline) on Loewenstein-Jensen slants with a 2mm diameter loop. Those cultures showing visible growth before four days were considered as rapid growers (Runyon's group IV). Other tests used for identical purpose were formamidase activity and growth on nutrient agar (1).

Niacin production (1), peroxidase activity (1), amidases (2), growth on p-nitrobenzoic (PNB) medium and on media containing either picric acid (0,1 and 0,2%) or sodium salicylate (0,5 and 1,0mg/ml) as well as tolerance to 0,2% of PAS (29, 30) were also included in this work.

To evaluate the best temperature for growth all isolates were subcultured, with diluted inocula, on Loewenstein-Jensen media and incubated at 25°C, 30°C, 37°C and 42°C for at least 60 days.

**Immune sera** — Fifty-six antisera against the representative serotypes of the MAIS complex were prepared in rabbits according to the schema of Schaefer (22).

**Antigens preparation for agglutination tests** — Using as inocula a loopful of growth obtained from Loewenstein-Jensen medium and resuspended in 5ml of sterile saline, Roux bottles with L.J. medium were inoculated with standard strains and our isolates. After incubation at 37°C for three weeks enough PBS with 0,5% of phenol was added to each culture in order to obtain standard suspensions, two for each microorganism, with turbidities matching tubes numbers 2 and 10 of Mac Farland's scale.

**Agglutination tests** — Two kinds of agglutination tests were performed in the present work: the tube agglutination test — TAT (16, 21, 22, 26) and the slide agglutination tests — SAT (6) slightly modified.

Regarding to the slide agglutination test the first step was to determine the recommended test dilution for each antiserum. That was achieved by reacting two-fold dilutions of each antiserum in PBS, starting 1:5, and homologous antigen standardized to tube 10 of Mac Far-

land's scale. Using fifty-dropping pipettes, 0,02ml of each antiserum dilution was dropped on a slide. Equal amounts of homologous antigen were dropped over the antiserum dilutions and mixed with a toothpick, starting always from the highest dilution. Readings were made within a minute and the titre was considered as the highest antiserum dilution which showed complete agglutination.

Concerning the test carried out with antigens prepared with our isolates a strain was classified into a particular serotype if the bacterial suspension was agglutinated by both antisera of this type and not by the remaining antisera. Agglutination caused by a single serum was not considered as type specific. All isolates even if negative in the SAT, were retested by the TAT. In this latter test, Schaefer's recommendations (22) were followed with no modifications.

**Drug resistance tests** — All our isolates were examined for drug resistance by the proportion method (3) slightly modified (19). Drugs in appropriate concentrations were incorporated to L.J. medium before inspissation. Drugs used and respective concentrations are found in Table 1.

**Table 1** — Drugs, concentrations used and critical proportions adopted for the determination of resistance to each tuberculostatic

Drugs	Concentrations in µg/ml of medium	Critical proportions
Isoniazid	0,2	1%
Streptomycin	4,0	10%
PAS	0,5	1%
Ethionamide	20,0	10%
Cycloserine	30,0	10%
Ethambutol	2,0	10%
Thiosemicarbazone	2,0	10%
Rifampicin	20,0	1%
Kanamycin	20,0	10%
Viomycin	20,0	10%
Capreomycin	20,0	10%

**Histopathological studies** — Fragments of the mesenteric lymph nodes, from which mycobacteria were isolated were sent to the "Instituto Biológico de São Paulo, Brasil". These were processed by the haematoxilin-eosin method to verify tissue alterations and by the Ziehl-Neelsen's staining to look for the presence of acid-fast bacilli. As controls, about 10% (40 strains) of lymph nodes fragments, from

which no mycobacteria were isolated, were examined by the same methods.

## Results

**Cultural and biochemical behavior** — Based upon the biochemical properties the ninety-five mycobacteria isolated from swine were classified as follows: five (5,26%) belonged to Runyon's group II, 87 (91,57%) to Runyon's group III and only three (3,15%) to group IV. Neither *Mycobacterium tuberculosis* nor *M. bovis* as well as representative of Runyon's group I were isolated. Among group II, two strains (2,10%) were classified as *M. flavescent*, two (2,10%) as *M. gordona* and one (1,05%) as MAIS complex, serotype *scrofulaceum*. Concerning group III, 73 (76,84%) strains were classified as MAIS complex, comprising 71 (74,73%) strains of serotype *intracellulare* and two (2,10%) of serotype *avium*. Fourteen (14,74%) strains belonged to *M. terrae* complex. The isolates of Runyon's group IV behaved as *M. fortuitum*.

The results of biochemical and cultural behavior are presented in Table 2. The list of strains belonging to Runyon's group II, III and IV as well as their designation are shown in Table 3.

**Serological properties** — Among 14 strains with biochemical behavior similar to MAIS complex serotype *scrofulaceum* only one has been serologically confirmed as that (serotype 41). The remaining 13 and other 60 not pigmented which had biochemical characteristics of MAIS complex included two strains, one chromogenic and other nonchromogenic which were classified as serotype 1, previously named *M. avium* serotype *intracellulare*, and were distributed among the following serotypes: 3,15% (S143, S163, S457) belonged to serotype 4; 18,94% (S79, S98, S102, S104, S106, S117, S118, S124, S134, S136, S148, S215, S350, S458, S462, S480, S483 and S492) to serotype 6; 10,52% (S114, S156, S168, S194, S197, S223, S233, S250, S413 and S499) to serotype 7; 20,00% (S44, S80, S82, S95, S101, S159, S164, S181, S188, S191, S206, S231, S276, S286, S355, S402, S440, S442 and S487) to serotype 8; 3,15% (S74, S113, S414) to serotype 10; 3,15% (S190, S281 and S427) to serotype 12; 1,05% (S125) to serotype 13; 2,10% (S138 and S269) to serotype 14 and 1,05% (S140) to serotype 15. The results concerning

these findings are presented in Table 4. Four strains (S226, S227, S242 and S245) showed cross reactions with antisera 8 and 9; one (S166) with antisera 6 and 8 and finally one (S78) with antisera 7 and 12. Five strains (S777, S128, S158, S284 and S419) were considered as not identified since their antigens have not reacted with any standard antisera. No strains belonging to serotype 2, 3, 9, 11, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 42 and 43 were isolated.

**Drug resistance tests** — All strains belonging to the MAIS complex were resistant to isoniazid and PAS and sensitive to cycloserine. With relation to streptomycin, ethionamide, ethambutol, rifampicin, thiosemicarbazone, capre-

mycin, kanamycin and viomycin the number of resistant strains was higher as it can be seen in Table 5. Concerning to the *M. terrae* complex it was observed that all strains were resistant to isoniazid, PAS and thiosemicarbazone and sensitive to ethambutol, ethionamide, rifampicin and viomycin. With reference to other drugs the results were variable. Since the number of strains classified as *M. gordonaiae*, *M. flavescentis* and *M. fortuitum* was low, no reliable comparative study could be made.

**Histopathological studies** — Histopathological examination of the lymph nodes from which opportunist mycobacteria were isolated did not reveal typical tuberculous lesions when exami-

**Table 2** — Biochemical and cultural properties of mycobacteria isolated from the lymph nodes of swine in São Paulo, Brazil. Number of positive tests in relation to the total number of strains in each species or complex studied

Biochemical and cultural properties	<i>M. gordonaiae</i> 2 strains	<i>M. flavescentis</i> 2 strains	MAIS complex 74 strains	<i>M. terrae</i> complex 14 strains	<i>M. fortuitum</i> 3 strains
Slow growth	2	2	74	14	0
Growth on nutrient agar	0	0	0	0	3
Growth on PNB	2	2	74	14	3
Growth at 25°C	2	2	74	14	3
Growth at 30°C	2	2	74	14	3
Growth at 37°C	2	2	74	14	3
Growth at 42,5°C	0	1	64	0	0
Growth at 45°C	0	0	43	0	0
Rough colonies on Loewenstein-Jensen medium	1	1	0	12	0
Photochromogenicity	0	0	0	0	0
Pigmentation	2	2	15	0	0
Niacin	0	0	0	0	0
Catalase	2	2	74	14	3
Catalase-pH 7,0/68°C	2	2	74	14	3
Semiquantitative catalase (more than 45mm)	2	2	9	14	3
Peroxidase	0	0	14	0	0
Nitrate reduction	0	2	0	14	3
Tellurite reduction	0	0	74	0	3
Arilsulfatase (3 days)	0	0	0	8	3
Arilsulfatase (15 days)	2	2	40	8	3
Tween 80 hydrolysis	2	2	0	14	2
Acetamidase	0	0	0	0	3
Benzamidase	0	0	0	0	0
Urease	0	2	56	0	3
Isonicotinamidase	0	0	0	0	0
Nicotinamidase	0	2	74	7	3
Pyrazinamidase	0	2	74	7	3
Salicilamidase	0	0	0	0	0
Allantoinase	0	0	0	0	3
Succinamidase	0	0	0	0	0
Malonamidase	0	0	0	0	0
Formamidase	0	0	0	0	0
Tolerance to PAS (0,2%)	0	0	53	14	3
Tolerance to picric acid (0,1%)	1	0	30	5	3
Tolerance to picric acid (0,2%)	0	0	0	0	3
Tolerance to sodium salicylate (0,5 mg/ml)	0	2	71	14	3
Tolerance to sodium salicylate (1,0 mg/ml)	0	2	70	14	3
Tolerance to sodium chloride (5%)	0	0	0	7	3

**Table 3** — Strains of mycobacteria isolated from swine according to species or complex. São Paulo, Brazil, 1976

Species or complexes	Strains									
<i>M. gordonaee</i>	S128,	S130								
<i>M. flavesiensis</i>	S142,	S261								
MAIS complex	S44, S98, S118, S143, S168, S206, S242, S350, S442, S499	S63, S101, S124, S148, S181, S215, S245, S355, S457, S499	S74, S102, S125, S156, S188, S223, S250, S402, S458, S499	S77, S104, S128, S158, S190, S226, S269, S413, S462, S499	S78, S106, S134, S159, S191, S227, S276, S414, S480, S499	S79, S113, S136, S163, S191, S231, S281, S419, S483, S499	S80, S114, S138, S164, S196, S233, S284, S427, S487, S499	S82, S117, S140, S166, S197, S236, S286, S440, S492, S499	S95	
<i>M. terrae</i> complex	S4, S381,	S17, S390,	S30, S408,	S37, S435,	S58, S489	S67,	S86,	S139,	S201,	
<i>M. fortuitum</i>	S193,	S252, S264								

**Table 4** — Distribution of serotypes among MAIS complex strains isolated from the mesenteric lymph nodes of apparently healthy swine. São Paulo, Brazil, 1976

Serotypes	Number of strains	%	Strains				
1	2	2,10	S195,	S236			
4	3	3,15	S143,	S163,	S457		
6	18	18,94	S79, S117, S148, S480,	S98, S118, S215, S483,	S102, S124, S350, S492	S104, S134, S458, S462,	S106, S136, S462,
7	10	10,52	S114, S223,	S156, S233,	S168, S250,	S194, S413,	S197, S499,
8	19	20,00	S44, S164, S231, S440,	S80, S181, S276, S442,	S82, S188, S286, S487	S95, S191, S355, S402,	S101, S206, S159,
10	3	3,15	S74,	S113,	S414		
12	3	3,15	S190,	S281,	S427		
13	1	1,05	S125				
14	2	2,10	S138,	S269			
15	1	1,05	S140				
41	1	1,05	S63				

ned by hematoxylin-eosin staining. Some materials showed inespecific alterations also found in lymph nodes from which no mycobacteria were isolated.

Staining by Ziehl-Neelsen's method revealed acid-fast bacilli in the following materials: 74, 118, 134, 136, 194, 233, 261, 264, 262 and 492. Usually the bacilli were found either dispersed or assembled into giant cells, fig. 1. No lesion

characteristic of tuberculosis could be found in the respective materials examined by hematoxylin-eosin staining.

The list of lymph nodes in which mycobacteria could be seen by Ziehl-Neelsen's staining and the most evident lesions observed in tissue sections stained by hematoxylin-eosin are presented in Table 6.

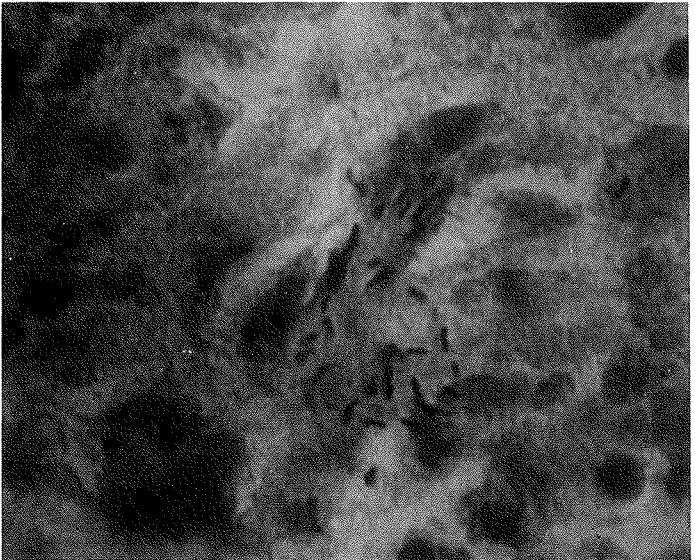
**Table 5** — Number of strains resistant to tuberculostatic drugs among mycobacteria isolated from swine. São Paulo, Brazil, 1976

Drugs	Concentration in $\mu\text{g}/\text{ml}$ of medium	Strains				
		<i>M. gordoniæ</i> 2 strains	<i>M. flavescens</i> 2 strains	MAIS complex 74 strains	<i>M. terræ complex</i> 14 strains	<i>M. fortuitum</i> 3 strains
Isoniazid	0,2	1	2	74	14	3
Streptomycin	4,0	1	2	68	1	3
PAS	0,5	2	2	74	14	3
Ethionamide	20,0	0	0	62	0	1
Cycloserine	30,0	0	0	0	2	1
Ethambutol	2,0	0	1	71	0	3
Rifampicin	20,0	1	2	61	0	1
Thiosemicarbazone	2,0	2	2	57	14	3
Capreomycin	20,0	1	0	69	3	2
Kanamycin	20,0	1	1	63	7	3
Viomycin	20,0	1	1	69	0	2

**Table 6** — Histopathological lesions more frequently observed in lymph nodes from which mycobacteria were isolated, São Paulo, Brazil, 1976

Material	Histopathological lesions more frequent observed	Mycobacteria isolated
74	Hyperplasia of lymphoid tissue	MAIS complex serotype 10
118	Oedema of lymphatic sinuses	MAIS complex serotype 6
134	Rarefaction of lymphoid tissue	MAIS complex serotype 6
136	Hyperplasia of lymphoid tissue	MAIS complex serotype 6
194	Hyperplasia of lymphoid tissue	MAIS complex serotype 7
233	Hyperplasia of lymphoid tissue	MAIS complex serotype 7
261	Rarefaction of reticular cells and discret eosinophilia	<i>M. flavescens</i>
264	Discret eosinophilia	<i>M. fortuitum</i>
462	Oedema of lymphatic sinuses	MAIS complex serotype 6
492	Hypoplasia of lymphatic tissue	MAIS complex serotype 6

**Figure 1** — Histological section of lymph node (Material 74) stained by Ziehl-Neelsen's method. Dispersed and agglomerated bacilli are seen in the tissue which showed no tuberculous-like lesions around bacilli. Magnification 100X



## Discussion

*Biochemical and cultural properties* — Detailed comments on the biochemical and cultural properties of the isolated mycobacteria shall be made only within Runyon's group III, where were allocated most strains of opportunist mycobacteria isolated in the present work, though, in some instances, considerations will be made in regard to other groups.

An unexpected result was provided by 14 strains of the MAIS complex which showed pigmentation very similar to that found among *scrofulaceum* serotype strains fact also observed with some strains of the MAIS complex included on the *avium* serotype (25).

With relation to the production of niacin, catalase and its inactivation at 68°C for 20' with the exception of nine strains of the MAIS complex which were able to produce more than 45mm of foam, nothing has been observed different of other reports. Peroxidase activity mentioned as negative for opportunist mycobacteria gave positive results in 14 strains of the MAIS complex. Similar results have been seldom reported by other workers (11, 14).

Regarding to the amidases it was frequently observed that strains belonging to the MAIS complex hydrolysed amidas 5 and 6, respectively nicotinamide and pyrazinamide. Rarely strains were also able to utilize urea showing a typical behavior of the serotype *scrofulaceum* of the MAIS complex.

Though some slight differences were observed concerning temperature of growth, nitrate reduction, tellurite reduction, arysulfatase and tolerance tests it can be concluded that the results were similar to those described by other authors and did not give any additional information which could be conclusive in the classification of these strains.

*Serological properties* — Our results indicated that the SAT was very useful on the typification of strains belonging to the MAIS complex. Since no discrepancies were observed between the SAT and the TAT, we believe that the former can substitute in routine work the tube agglutination test.

Only five out of 74 strains of the MAIS complex were not classified and might be new serotype as it has been recently described for MAIS complex microorganisms (17).

It is curious that among the 74 strains none belonged to serotypes 2, 3, 9, 11, 16, 17, 18,

19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 42 and 43. On the other hand it was verified a strong predominance of the following serotypes: 6 (18 strains), 7 (10 strains) and 8 (19 strains) followed by serotypes 4, 10, 12 (3 strains), 14 (2 strains) and 13 and 15 with one strains each. The fact that some serological types were not found among our isolates perhaps could be explained on the basis of the number of strains isolated in the present work, in our opinion still low. Nevertheless it became evident the importance of at least three serotypes as far as swines are concerned: 6, 7 and 8. Regarding serotype 7 nothing can be said but the remaining two have been both reported as very common in other countries (12, 23, 26, 27, 28, 32).

The isolation of two strains of the MAIS complex serotype 1 (formely called *M. avium*) seems to be a frequency extremely low when compared with other data reporting *avium* serotype much more frequently (9). However it must be observed that those authours have used for the classification of their strains only biochemical and pathogenic tests. It was possible that many of their isolates might be *intracellularare* strains virulent for chickens (32). Another fact is that many reports on the literature (12, 23, 32, 15) have pointed out the MAIS complex, serotype 2, as the most frequent among swine contrasting with our findings where both isolates belonged to serotype 1.

The isolation of the *scrofulaceum* serotype from the lymph nodes of swine appears to be a very rare event being very difficult to evaluate the role played by it as well as by other MAIS complex strains, belonging to other serotypes than 6, 7 and 8, in regard to disease among swine.

Based upon other authors findings (6, 22) and in the low frequency observed in the present work we could say that the participations of Runyon's group II and IV on the pathogenesis of swine mycobacteria are very poor and probably not significant. The same could be applied to the strains belonging to the *M. terrae* complex, included in Runyon's group III.

*Drug resistance tests* — The behavior of different strains of mycobacteria as far as drug resistance is concerned has demonstrated that, generally, when a comparison was possible, our findings were not opposite to those observed by other authors (13, 24).

On account of the higher number of MAIS

complex isolates only this group deserves deeper considerations, as it has been done so far in the present work. It was observed that the resistance pattern of the *scrofulaceum* serotype was similar to other strains of the MAIS complex. This kind of behavior has also contributed for the species *M. scrofulaceum* be included in the MAIS complex group (24). With reference to this group it was observed that these strains were resistant to most drugs used in the sensitivity tests. With the exception of cycloserine to which all strains were sensitive, in relation to other drugs, most strains were resistant. Usually *M. terrae* complex strains were more sensitive to streptomycin than MAIS complex strains and as a rule were sensitive to ethionamide, ethambutol, rifampicin and viomycin. These data confirmed other authors' opinion (13) concerning the use of drug resistance tests as a clue for mycobacteria identification at least in Runyon's group III.

**Histopathological studies** — In the histopathological examinations carried out with fragments of lymph nodes from which mycobacteria were isolated two aspects deserve to be commented: a) presence of acid-fast bacilli in tissues. b) verification of tuberculous-like lesions in the histological preparations.

In the first case our aim was to confirm that the animals from which mycobacteria were isolated were actually infected. Though fragments of all lymph nodes positive on culture were examined by Ziehl-Neelsen's staining, only 10 materials (respectively numbers 74, 118, 134, 136, 194, 233, 261, 264, 262 and 492) showed acid-fast bacilli either dispersed or agglomerated in the tissue. This low number of positive materials in Ziehl-Neelsen's staining and its significance may be explained as follows. If serial cuts had been made probably more extensive areas would be studied giving consequently a higher number of positive results. Though in mycobacteriosis may occur extensive lesions indistinguishable of typical tuberculosis, generally they are very tiny (26). Thus, it is probable that the fragments collected for examination had not either lesions or fast acid bacilli. As it was commented in the results, in all cases, the histopathological findings did not reveal lesions which suggest tuberculosis. Most alterations found were also seen in the lymph nodes from which no mycobacteria were isolated. Among these lesions the following appeared more commonly: hyperplasia and

hypoplasia of the lymphatic tissue, edema of the lymphatic sinuses and decreasing of reticular cells. It seems that these alterations are found very often in mesenteric lymph nodes of swine and the fact that it was possible to find acid-fast bacilli in some lymph nodes with no significant lesion surrounding them allowed us to conclude that the alterations observed in some lymph nodes from which mycobacteria were isolated can not be correlated with the opportunist mycobacteria.

Another important point is that with the exception of materials 261 and 264 from which were isolated respectively *M. flavescentes* and *M. fortuitum*, all the remaining have provided isolates which were classified as one of the *intracellulare* serotypes of the MAIS complex. Although this fact could be explained by the higher frequency of isolates within this group, it shall be advisable reminding that other authors have also found that this group of microorganisms is more pathogenic for swine than other opportunist mycobacteria (16, 26, 27).

Based upon our results we think that Ziehl-Neelsen's staining of lymph nodes is an auxiliary tool for the diagnosis of sub-clinical mycobacteriosis, mainly when lymphatic tissue is involved in the process with the presence of very tiny lesions.

**Epidemiological considerations on the opportunist mycobacteria isolated from apparently healthy swine** — The examination of 500 mesenteric lymph nodes of swine permitted the conclusion that Runyon's group III strains, represented by the MAIS complex, are the most important among pigs. That was confirmed by other authors who observed that *intracellulare* serotypes, mainly serotype 6 can cause mesenteric lymphadenitis in hogs (16, 26, 27).

Though at least 23 serotypes have been described in the MAIS complex (22), it became evident in this work that in Brazil strains of serotypes 6 and 8 are the most frequent among swine. The remaining MAIS complex strains found in low number by us and others (12; 18, 23) probably do not play an important role as aetiological agents of swine mycobacteriosis.

It is probable that opportunist mycobacteria are mainly transmitted by soil which can contaminate water and food to be given to animals (20). How can we therefore explain the relationship between the higher frequency of serotypes 6 and 8 swine and the presence of these serotypes in soil? In Brazil, there is no work on

the serology of opportunist mycobacteria isolated from soil. The isolation of several strains of the MAIS complex from soil in Brazil was not completed with serological studies (7). Thus, since data are missing concerning serology of strains isolated from soil, we think that some of the following possibilities should be considered: a) serotypes 6 and 8 are more prevalent in soil either due to a direct influence of pigs or not and have more possibilities of infecting these animals; b) the different serotypes of the MAIS complex are more or less equally distributed in soil and pigs are more susceptible to infection by serotypes 6 and 8; c) pigs are more liable to be infected by these serotypes and the infected animals keep the soil constantly contaminated, causing consequently a higher frequency of these serotypes in soils where pigs are bred.

Since soil and consequently air dust can harbour these microorganisms we could accept the hypothesis that the contamination of lymph nodes might have happened during collection of them in slaughterhouses. This possibility shall be eliminated since special care has been undertaken to avoid that, by quick boiling of

lymph nodes before bacteriological examinations. Besides that we shall remind the findings that 10% of positive lymph nodes showed acid-fast bacilli in tissue sections stained by Ziehl-Neelsen's method.

Among other mycobacteria belonging to the MAIS complex, special mention must be made regarding the two strains of serotype *avium* isolated in the present work. Since no histopathological lesions were seen in the respective materials examined by haematoxilin-eosin staining we can conclude that these findings were not different from those observed for most materials from which *intracellulare* serotypes have been isolated.

Though *M. flavescentes* and *M. gordonaiae* are generally considered as saprophytes, acid-fast bacilli were seen in materials from which the former was isolated, when tissue sections of it were stained by Ziehl-Neelsen's technique, proving that, at least in this case, this microorganism was indeed causing the infection. Regarding group IV similar considerations could be made since *M. fortuitum* was isolated from a lymph node which has also showed acid-fast bacilli by Ziehl-Neelsen's staining.

## References

- Allen, B. & Baker, F.J. — *Mycobacteria* — isolation identification and sensitivity test. London, Butterworths, 1968.
- Boinicke, R. — Identification of mycobacteria by biochemical method. Bull.Union Int.Contre Tuberc., 32:13-68, 1962.
- Canetti, G.; Risi, N. & Grosset, J. — Measure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par le methods de proportions. Rev.Tuberc.Pneumol., 27:217-272, 1963.
- Castro, A.F. Pestana de & Nemoto, H. — Occurrence of a typical mycobacteria in the lymph nodes of apparently healthy slaughtered cattle in São Paulo, Brazil. Rev. Microbiol., 3:75-78, 1972.
- Engbaek, H.C.; Vergmann, B.; Baess, I. & Bentzon, M.W. — *Mycobacterium avium*: A bacteriological and epidemiological study of *M. avium* isolated from man and animals in Denmark. II — Strains isolated from man. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 72:295-312, 1968.
- Engel, H.W.B. & Berwald, L.G. — A simplified agglutination test for serologic typing of mycobacteria. Amer.Rev.Respir. Dis., 101:112-115, 1970.
- Gontijo Filho, P.P. — Isolamento e identificação de micobactérias do solo. Rio de Janeiro, 1972. (Tese — Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- Hobby, Gladys L.; Redmond, W.B.; Runyon, E.H.; Schaefer, W.; Wayne, L. & Wichelhausen, R.H. — A study on pulmonary disease associated with mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: identification and characterization of the mycobacteria. Amer. Rev.Respir. Dis., 95:954-971, 1967.
- Jorgensen, J.B.; Haarbo, K.; Dam, A. & Engbaek, H.C. — An enzootic of pulmonary tuberculosis in pigs caused by *M. avium*. Acta Vet.Scand., 13:56-57, 1972.
- Juhlin, L. — Contribution to the classification of *Mycobacteria* and *Nocardia*. Acta Patol. Microbiol.Scand., 70 (189):120, 1967.
- Kubin, M.; Dvorsky, K.R.; Eisnerova, R.; Mezensky, L.; Fran, K. & Matejka, M. — Pulmonary and non pulmonary disease in human due to avian mycobacteria. II — Microbiological analysis of strain isolated. Amer. Respir. Dis., 94:31-39, 1966.
- Kubin, M. & Matuskova, E. — Serological typing of Mycobacteria for tracing possible of avian mycobacterial infections in man. Bul. WHO, 39:657-662, 1968.
- Marks, J. — Classification of the mycobacteria in relation to clinical significance. Tubercl., 53:259-264, 1972.
- Onet, E.; Fanea, E. & Vaida, T. — Recherches sur la fréquence et les types de mycobactéries isolés chez les porcs apparemment sains. Recl.Med.Vet., 147: 1225-1232, 1967.
- Pattyn, S.R. — Serogrouping of *Mycobacterium avium* and "Battey" mycobacterium. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt. Orig., 208:449-452, 1968.
- Reznikov, M.; Leggo, J.H. & Tuffley, R.E. — Further investigations of an outbreak of mycobacterial lymphadenitis at a deep litter piggery. Aust.Vet.J., 47: 622-623, 1971.

17. Reznikov, M. & Dawson, D.J. — Serological examination of some strains that are in the *Mycobacterium avium* — *intracellulare* — *scrofulaceum* complex but do not belong to Schaefer's serotypes. App.Microbiol., 26:470-473, 1973.
18. Reznikov, M.; Stranger, R.S.; Leggo, J.H. & Young, A.V. — Mycobacterial lymphadenitis in pigs on the darling dows. Aust. Vet. J., 264:264-265, 1973.
19. Rosenberg, J.; Waisbich, E & Passos, M.C.R. — Resistência primária em 906 casos de tuberculose pulmonar proveniente de diversas regiões do Brasil. Rev. Serv. Nac.Tuberc., 11:1-25, 1967.
20. Runyon, E.H. — Pathogenic mycobacteria. Adv.Tuberc.Res., 14:235-287, 1965.
21. Saito, H. & Kubica, G.P. — Serologic studies of avium-group III nonphotochromogen complex by agglutination test. Amer.Resp.Dis., 98:47-59, 1967.
22. Schaefer, W.B. — Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutinations. Amer.Rev.Respir.Dis., 92:85-93, 1965.
23. Schaefer, W.B. — Serological identification of the atypical mycobacteria and its value in epidemiologic studies. Amer.Rev.Respir.Dis., 96:115-118, 1967.
24. Tacquet, A.; Tison, F.; Devulder, B. & Ross, P. — Organization et activités du laboratoire Central d'identification des mycobactéries de l'Institut Pasteur Lille (France) 1961-1965. Bull.Union.Int.Contre Tuberc., 39:31-38, 1967.
25. Tacquet, A.; Tison, F.; Plancot, M.T.; Devulder, B. & Ross, P. — Les mycobactéries scotochromogènes Bull. Union. Int. Contre Tuberc., 39:39-46, 1967.
26. Tammemagi, L. & Simmons, G.C. — Battey type mycobacterial infection in pigs in Quensland. Aust.Vet. J., 44:121, 1968.
27. Tammemagi, L. & Simons, G.C. — Further observations on Battey mycobacterial infection of pigs. Aust.Vet.J., 45:38, 1969.
28. Tammemagi, L. & Simmons, G.C. — BCG vaccination against Battey type mycobacteria in pigs. Aust.Vet.J., 46:284-286, 1970.
29. Tsukamura, M. — Identification of group II scotochromogens and group III nonphotochromogens of mycobacteria. Tubercle, 50:51-60, 1969.
30. Tsukamura, M. — Identification of mycobacteria. Tubercle, 48:311-338, 1967.
31. Vestal, A.L. — Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. Atlanta, Georgia, Department of Health, Education and Welfare, National Communicable Disease Center, 1969. 118 p.
32. Yoder, W.D. & Schaefer, W.B. — Comparison of the seroagglutination tests with the pathogenecity test in the chicken for the identification of *Mycobacterium avium*. Amer.Rev.Resp.Dis., 103:173-178, 1971.

## Influência de fatores de crescimento em Chlorella

Cenira Vanacor Barroso\*  
 & Auta Marietta de Jesus Nonato\*

### Resumo

Influência de vários fatores sobre o crescimento de duas amostras de algas unicelulares, designadas *Chlorella 2 I* e *Chlorella 11 I*. Foram estudadas fontes de carbono como sacarose, glicose e acetato, na proporção de 0,4g de carbono por 100ml de solução, na presença e ausência de luz, sem aeração e com agitação. Os dados obtidos confirmaram os da literatura, demonstrando que a glicose, para ambas as amostras, foi a melhor fonte de carbono. A troca da fonte de nitrogênio, de nitrato (0,1g%) para polipeptona (0,1g%), sem aeração forçada, em presença de luz e agitação, não apresentou resultados satisfatórios. Usando glicose e nitrato, como fontes de carbono e nitrogênio, foi testada a adição de algumas vitaminas. A adição de cianocobalamina (0,01mg%), tiamina (0,01mg%), biotina (0,01mg%) e extrato de levedo (0,01mg%) não provocou aumento, em qualquer das duas espécies.

### Summary

#### *The influence of growth factors upon Chlorella*

The influence of several factors on the growth of unicellular algae named *Chlorella 2 I* and *Chlorella 11 I*. Carbon sources as sacarose, dextrose and acetate in a proportion of 0.4g of carbon per 100ml of solution were assayed in presence and absence of light, without aeration. Dextrose behaved as the better carbon source in both conditions. When polipeptone (0.1g%) was used instead of nitrate (0.1g%), without aeration in presence of light and agitation the results were unsatisfactory. Using dextrose and nitrate as carbon and nitrogen source, some vitamins were assayed. The addition of cyanocobalamin (0.01mg%), thiamine (0.01mg%), biotin (0.01mg%) and yeast extract (0.1g%) did not improve growth of both strains.

### Introdução

A influência da fonte de carbono no crescimento de *Chlorella* foi observada por vários pesquisadores. Griffths & col. (5), testaram vários compostos de carbono na proporção de 1g%, no crescimento de *Chlorella vulgaris*, mostrando que a glicose foi melhor assimilada. Mais tarde Griffths (4), trabalhando com *Chlorella vulgaris* cepa Emerson, demonstrou ser a glicose uma fonte de nutriente, na concentração de 0,05M ou 0,9g%, usando ar com 1% de CO<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> isento de ar, na presença e na ausência de luz. Rodrigues-Lopes (7), em estudo mais completo, confirmou os dados de Griffths, trabalhando com várias monoses, na proporção de 16mM (ou 0,28g%) em ausência

e presença de luz, com e sem aeração. Demonstrou haver melhor crescimento com frutose e manose, sem aeração, em presença de luz.

Os objetivos do presente trabalho foram: verificar a validade dos dados da literatura, com relação à utilização de fonte de carbono, para as duas espécies de *Chlorella* isoladas; estabelecer a melhor fonte de carbono, observar o efeito da troca de nitrogênio, de nitrato para polipeptona, no crescimento das amostras; finalmente, verificar se a adição de vitaminas, em meio padronizado quanto à fonte de carbono e nitrogênio, acelera ou não o crescimento.

\* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Ilha do Fundão, 20000 Rio de Janeiro RJ.

## Material e Métodos

**Amostras** — Algas isoladas de águas próximas ao pontilhão, atrás do Bloco H na Ilha do Fundão; classificadas segundo Bicudo & col. (1) e Chapman & col. (2): *Chlorella* 2 l — células de dimensões diametrais de 3,6 a 4,5  $\mu\text{m}$ ; e *Chlorella* 11 l — células de dimensões diametrais de 5,4 a 8,1  $\mu\text{m}$ .

**Meios** — Para obtenção de cultura estoque: Meio Difco Bacto Algae culture — código 0545; Nitrito de sódio 1,0g/l; Fosfato dipotássico 0,25g/l; Sulfato de magnésio 0,513g/l; Cloreto de amônio 50mg/l; Cloreto de cálcio 58mg/l; Cloreto férreo 3mg/l; Bacto agar 15g/l. Esterilização: 1/2 atmosfera, por 15 minutos. Para obtenção das curvas de crescimento: Meio da Difco sem o agar-agar.

**Cultura Estoque** — Cultura axênica de *Chlorella* 2 l e *Chlorella* 11 l foram mantidas a 30°C, no período de 7 dias, em 4ml de meio Difco inclinado. O meio foi colocado em tubos de ensaio, de 16mm de diâmetro por 160mm de comprimento, colocados em plano inclinado, sob lâmpadas de 20 watts, situadas a 20cm de distância. As células obtidas foram lavadas e ressuspensas com solução salina contendo 0,85g de NaCl por litro de solução e utilizadas para a determinação das curvas de crescimento.

**Curvas de crescimento** — Determinadas em frascos Erlenmeyer de 250ml, contendo 50ml de meio Difco não agarizado, com pH inicial 6,0. Os frascos foram colocados em agitador mecânico Thomas Scientific American, modelo 8-287-E, com 50 a 100 oscilações por minuto. A iluminação dos cultivos foi feita por duas luminárias, contendo, cada uma, quatro lâmpadas fluorescentes de 20 watts, dispostas horizontalmente a 20cm. de distância. A absorbância inicial dos cultivos era 0,1 e correspondia, na curva de peso seco, a 0,35g de células secas para *Chlorella* 2 l e 0,23 de células secas para *chlorella* 11 l, no coprimento de onda de 430nm, medido em aparelho Spectronic 20 da Bausch Lomb. Em intervalos de 24 horas as amostras foram retiradas, lavadas com solução salina e ressuspensas na mesma solução, para a leitura da absorbância. O tempo total das experiências foi de 7 dias, que incluíram: a — curva de crescimento em meio Difco sem fonte de carbono e sem aeração forçada, em presença de luz. Obs.: nas experiências

seguintes, foi feito um branco, dentro das condições deste item; b — Curvas de crescimento em meio Difco com as seguintes fontes de carbono, em presença e ausência de luz: sacarose 0,95g%, glicose 1,0g% e acetato 1,35g%. Estes valores correspondem a 0,4g de carbono %. Obs.: nas experiências em ausência de luz, os frascos foram envolvidos em papel laminado "Reynold Wrap"; c — curvas de crescimento em meio Difco sem nitrato, com 1g% de glicose, no claro, onde se adicionou 0,1g% de peptona; d — curva de crescimento em meio Difco com nitrato, com 1g% de glicose, no claro, onde se adicionou 0,1g de extrato de levedo; e — curvas de crescimento em meio Difco com 1g% de glicose, no claro, sem extrato de levedo, onde se estudou, em separado, a influência da adição de vitaminas: 0,01mg% de cianocobalamina, 0,1mg% tiamina ou 0,01mg% biotina, segundo Endo & col. (3).

Em base às curvas de crescimento obtidas, foi calculado o valor da velocidade específica de crescimento e do tempo de geração para cada curva.

## Resultados e Discussão

A representação gráfica do crescimento da alga está contida nas figs. 1-4 e os dados agrupados na Tabela 1. Os resultados revelam que a glicose foi o açúcar melhor utilizado, principalmente em presença de luz. Isto é dedutível, pois, nessas condições, o metabolismo autotrófico é adicionado do heterotrófico, confirmado os dados na literatura.

A sacarose foi mau utilizada pelas duas amostras. Não houve, basicamente, influência da adição de sacarose, como se verifica pelas curvas de crescimento, em que, a em meio mineral, apresenta praticamente o mesmo perfil que a curva com sacarose. Deduz-se que as algas estudadas não contêm invertase em seu aparelhamento enzimático ou as condições de pH adotadas não favoreceram a atividade dessa enzima. Griffiths & col. (5), verificaram resultado semelhante com *Chlorella vulgaris*.

O acetato foi utilizado por *Chlorella* 2l, tanto em presença como em ausência de luz, porém com crescimento inferior ao obtido em meio adicionado de glicose. A utilização não foi comprovada para *Chlorella* 11 l, tanto no claro como no escuro, pois o crescimento foi menor do que o obtido com meio base.

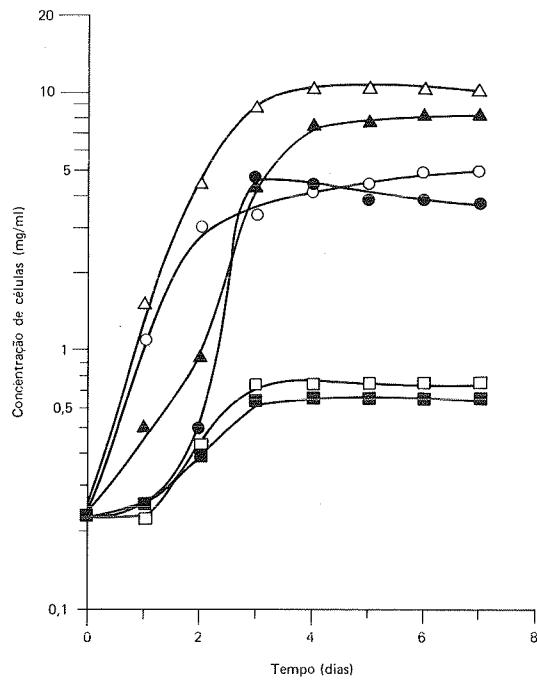
Nakayama & col. (6) estudaram a adição de

**Tabela 1** — Crescimento da *Chlorella* 11I e da *Chlorella* 2I em mg células/ml de meio Difco Algae Culture 0545 adicionado de 1g% de glicose em presença de luz

Tempo (dias)	Chlorella 11 I		Chlorella 2 I	
	A) Com ni- trato	B) Com polipeptona	A) Com ni- trato	B) Com polipeptona
	A (mg/ml)	B (mg/ml)	A (mg/ml)	B (mg/ml)
0	0,23	0,23	1,75	1,3
1	1,2	1,7	1,8	7,7
2	4,4	4,8	3,8	10,6
3	8,8	8,2	47,0	13,0
4	10,5	8,1	44,0	15,1
5	10,2	8,2	47,0	14,1
6	10,2	8,2	47,0	14,1
7	10,2	8,2	47,0	14,1

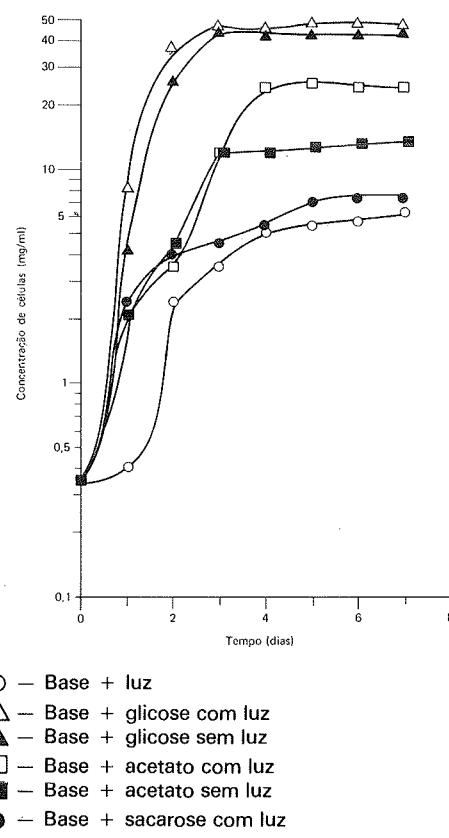
A) Com nitrito      0,1g%  
B) Com polipeptona      0,1g%

**Figura 1** — Crescimento de *Chlorella* 11I em meio Difco (Base) adicionado de fontes de carbono

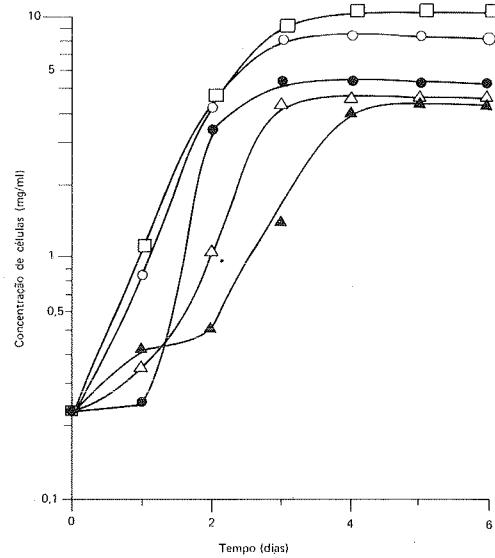


— ○ — Base + luz  
— △ — Base + glicose, com luz  
— ▲ — Base + glicose, sem luz  
— □ — Base + acetato, com luz  
— ■ — Base + acetato, sem luz  
— ● — Base + sacarose, com luz

**Figura 2** — Crescimento de *Chlorella* 2I em meio Difco adicionado de fontes de carbono

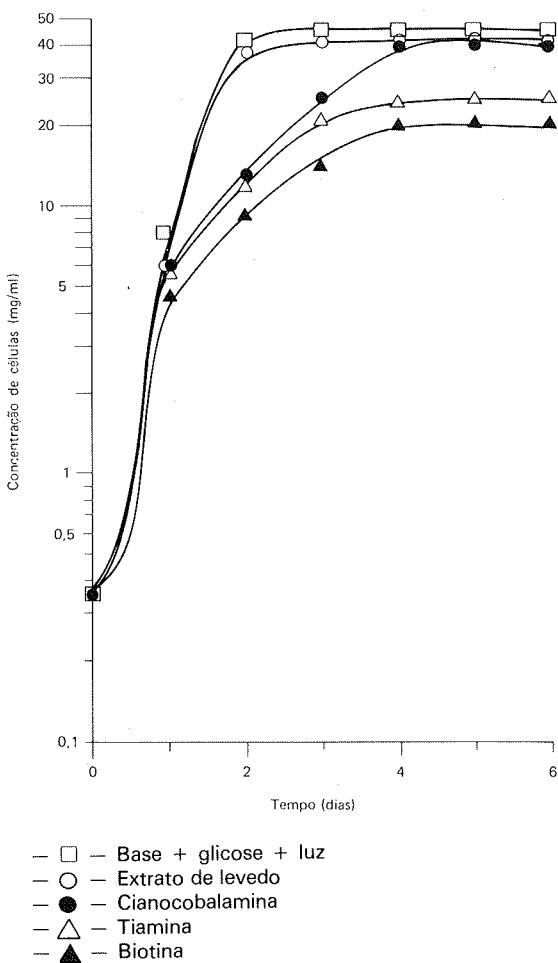


**Figura 3** — Crescimento de *Chlorella* 11I em meio Difco adicionado de vitaminas



— □ — Base + glicose + luz  
— ○ — Extrato de levedo  
— ● — Cianocobalamina  
— △ — Tiamina  
— ▲ — Biotina

**Figura 4** — Crescimento de *Chlorella* 21 em meio Difco adicionado de vitaminas



polipeptona a um meio contendo nitrato e verificaram aumento considerável no crescimento de *Chlorella* sp. 5119, em condições aeróbias. Com base neste trabalho, foi verificado se a troca do nitrogênio inorgânico por nitrogênio orgânico proporcionaria resultados semelhantes. A Tabela 1 evidencia que o nitrato proporciona maior crescimento, para ambas as amostras.

Foi verificado também que a adição de vitaminas não acelera o crescimento, em qualquer das amostras. Com adição de tiamina e de biotina, há inibição do crescimento, para ambas as amostras.

As observações feitas permitem destacar as conclusões mencionadas em seguida. 1 — Quando se trabalha com meio adicionado de glicose, em presença de luz, com agitação mecânica, sem aeração forçada, o melhor crescimento é conseguido em quatro dias para a *Chlorella* 111 e em três para a *Chlorella* 21; 2 — As algas crescem bem em meio mineral, adicionado de glicose, em ausência de luz; 3 — A velocidade específica de crescimento para a *Chlorella* 111 foi de  $0,052 \text{ h}^{-1}$ , com um tempo de geração de 12 horas; para *Chlorella* 21, foi de  $0,138 \text{ h}^{-1}$ , com um tempo de geração de 5 horas, quando cultivadas em glicose, no claro; 4 — A troca do nitrogênio inorgânico por nitrogênio orgânico, para ambas as amostras, não favoreceu o crescimento, em presença de glicose e luz; 5 — A adição de vitaminas ao meio, em presença de glicose, luz e nitrato como fonte de nitrogênio, não trouxe vantagens ao processo.

## Referências Bibliográficas

1. Bicudo, C.E.M. & Bicudo, R.M.T. — Algas de águas continentais brasileiras. Fundação Brasileira para o Desenvolvimento do Ensino de Ciências, 1970.
2. Chapman, V. J. & Chapman D.J. — The algae. MacMillan, 1973.
3. Endo, H.; Nakajima, K.; Chino, R. & Shirota, M. — Growth characteristics and cellular components of *Chlorella vulgaris* heterotrophic for growing strain. Agr. Biol. Chem., 38:9-18, 1974.
4. Griffiths, D.J., — The effects of glucose on cell division in *Chlorella vulgaris*, Beijerinck (Emerson Strain). Annals of Botany, 27(107), 1963.
5. Griffiths, D.J.; Thresher, C.L. & Street, H.E. — The heterotrophic nutrition of *Chlorella vulgaris* (Brannon n.º 1 Strain). Annals of Botany, 24(93), 1960.
6. Nakayama, O.; Ueno, T. & Tsuchiya, F. — Heterotrophic culture of algae in a closed system. J. Ferm. Technol., 52:225-232, 1974.
7. Rodrigues-Lopez, M. — Utilization of sugars by *Chlorella* under variations conditions. J. Gen. Microbiol., 43: 139-143, 1966.

## Influência da concentração de NaNO<sub>3</sub> na produção de biomassa de Chlorella homosphaera\*

F.P. de França\*\*  
& M.C. Yuan\*\*

### Resumo

A microalga *Chlorella homosphaera* foi cultivada em condição mixotrófica usando 1,00% (p/v) de glicose. Como fonte luminosa, foram usadas seis lâmpadas fluorescentes G.E. de 20 watts, à distância de 30 cm, assegurando iluminação homogênea para todo o cultivo. A agitação foi em agitador recíproco a 200 oscilações por minuto e à concentração inicial de células de 0,03% (p/v). As concentrações de NaNO<sub>3</sub> testadas foram de 0,06 a 5,00% (p/v). Maiores quantidades de biomassa foram obtidas nas concentrações de 0,10 a 1,00% (p/v) de NaNO<sub>3</sub>, resultando em rendimento 0,50g de biomassa/g de glicose. Inibição de crescimento ocorreu quando a concentração de NaNO<sub>3</sub> foi de 3,00% (p/v). O aumento da concentração de nitrato no meio de cultura resultou no aumento do conteúdo de proteína nas células. O estudo cinético da utilização de glicose 1,00% (p/v) e nitrato (0,10% - p/v) mostrou o consumo de 75% desses nutrientes, após 72h de cultivo.

### Summary

#### *Influence of the NaNO<sub>3</sub> concentration on the production of Chlorella homosphaera biomass*

The microalga *Chlorella homosphaera* was cultivated in mixotrophic conditions using 1.00% (w/v) glucose concentration. As luminous source, six fluorescent light bulbs placed at 30 cm distance were used, assuring an homogeneous illumination for all cultures. Agitation was in a reciprocal Shaker at 200 strokes/min. and initial cell mass concentration 0.03% (w/v). Experiments on the influence of NaNO<sub>3</sub> concentration, both in biomass production and protein content of the cell were carried out. Concentrations of NaNO<sub>3</sub> employed were in the range of 0.06 – 5.00% (w/v). From 0.10% (w/v) to 1.00% (w/v) the production of biomass was quite satisfactory, resulting in a yield factor of 0.50g of biomass/g of glucose. Inhibition of the algal growth occurred at a sodium nitrate concentration of 3.00% (w/v). Increasing the nitrate concentration in the culture medium resulted in a increase in the cell protein content. Kinetic study of both glucose 1.00% (w / v) and nitrate 0.10% (w / v) utilization showed a 75% comsumption of these nutrients after 72 hours of cultivation.

### Introdução

A produção de proteínas por fontes não convencionais, como a partir de leveduras, bolores e algas, tem conduzido à utilização de algas microscópicas como fonte de alimentação humana ou para ração animal, motivando investigações no campo da fisiologia (1, 2 e 4).

Recentemente, as microalgas assumiram importância fundamental, na determinação do grau de eutroficação de lagoas e no tratamento de resíduos nitro-fosfatados, com a subsequen-

te transformação desses em ração animal (5, 18 e 19).

Entretanto, é fundamental, para a obtenção de biomassa, o conhecimento do valor nutritivo e a padronização biológica, para determinação das condições necessárias à produção (8).

A utilização de compostos inorgânicos por microalgas tem sido estudada por numerosos pesquisadores (10, 12 e 14), os quais têm demonstrado que a fonte de nitrogênio, as dife-

\* Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química, U.F.R.J. Ilha do Fundão, 20000 Rio de Janeiro RJ. — Trabalho realizado com auxílio do CNPq e CEPG — U.F.R.J.

\*\* Bolsistas do C.N.Pq.

rentes velocidades de utilização do nitrogênio e a variação do metabolismo conduzem ao aumento no teor de vários aminoácidos, na célula. Spoehr & Milner (15) observaram que o conteúdo de nitrogênio em células varia muito, dependendo do suprimento da fonte nitrogênada. Pratt & Johnson (11), trabalhando em condição fotoautotrófica, verificaram que os teores de lipídios e proteínas, em células de *Chlorella*, variavam quando usaram apenas dois valores para relação carbono/nitrogênio no meio.

Este trabalho visa verificar a influência da concentração de nitrato, na produção de biomassa e no teor proteico da célula.

## Material e Métodos

*Meio de Cultura (base)* —  $\text{NaNO}_3$ , 1,0g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,250g;  $\text{MgSO}_4$ , 0,513g;  $\text{CaCl}_2$ , 0,058g;  $\text{FeCl}_3$ , 0,003g; água destilada q.s.p., 1.000ml.

*Inóculo* — Foi usada cultura de *Chlorella homosphaera*, isolada de água represada, na cidade do Rio de Janeiro. Para padronização do inóculo, a microalga foi mantida em meio de cultura base, em condição mixotrófica. Em intervalos de 12h, foram retiradas alíquotas de 5ml e as células separadas por centrifugação a 8.000xg, lavadas três vezes com água destilada e ressuspensas também em água destilada. A concentração celular foi determinada através da curva de calibração que relacionava absorbância a 430nm, medida em espectrofotômetro Spectronic 20, com peso seco de células. A temperatura para determinação da percentagem de umidade de secagem foi 90°C, e as medidas feitas até peso constante. Com os dados obtidos, foi traçada a curva de crescimento, obtendo-se o máximo de crescimento com 72h de cultivo, com velocidade específica de crescimento igual a  $0,14\text{h}^{-1}$ .

Em todas as experiências, foi usado, como inóculo, 0,03g de células para 100ml do meio de cultura.

*Condições de cultivo* — Volume do meio de cultura: 100ml/Erlenmeyer de 500ml. Agitação: 100 oscilações por minuto, em agitador recíproco marca Artur H. Thomas. Temperatura, 30°C; pH inicial, 6,0; células iniciais, 0,03% (p/v). Iluminação: seis lâmpadas fluorescentes GE, de 20 watts à distância de 30 cm.

Os experimentos foram feitos em meio de

cultura base — isento de sua fonte original de nitrogênio — adicionado de 1,00% (p/v) de glicose, sendo testadas as seguintes concentrações de  $\text{NaNO}_3$ : 0,06 — 0,10 — 0,12 — 0,18 — 0,24 — 0,50 — 1,00 — 2,00 — 3,00 — 4,00 e 5,00% (p/v).

*Determinação da biomassa* — Após 72h de crescimento, as células foram centrifugadas e lavadas três vezes com água destilada. A absorbância, determinada após a ressuspensão das células foi relacionada com o peso seco celular.

*Determinação de proteínas* — Após 72h de cultivo, as células foram centrifugadas e lavadas três vezes com água destilada e, em seguida, tratadas três vezes com metanol P.A. para extração da clorofila e duas vezes com água destilada, para remoção de excesso de metanol. Depois de clarificadas, foram ressuspensas em água destilada, tratadas com solução de NaOH a 20% e aquecidas em B.M. a 100°C, por 10 min. Em seguida, foi feita a dosagem de proteínas pelo método de Stickland (16).

A curva padrão foi feita usando Albumina Bovina Fração V — SIGMA, contendo 16% de nitrogênio total.

*Determinação de nitrato* — foi feita de acordo com os trabalhos de Smith (13) e Swann & Adams (17).

*Determinação de glicose* — Feita segundo a técnica da glicose oxidase, de acordo com Harrel & col. (6).

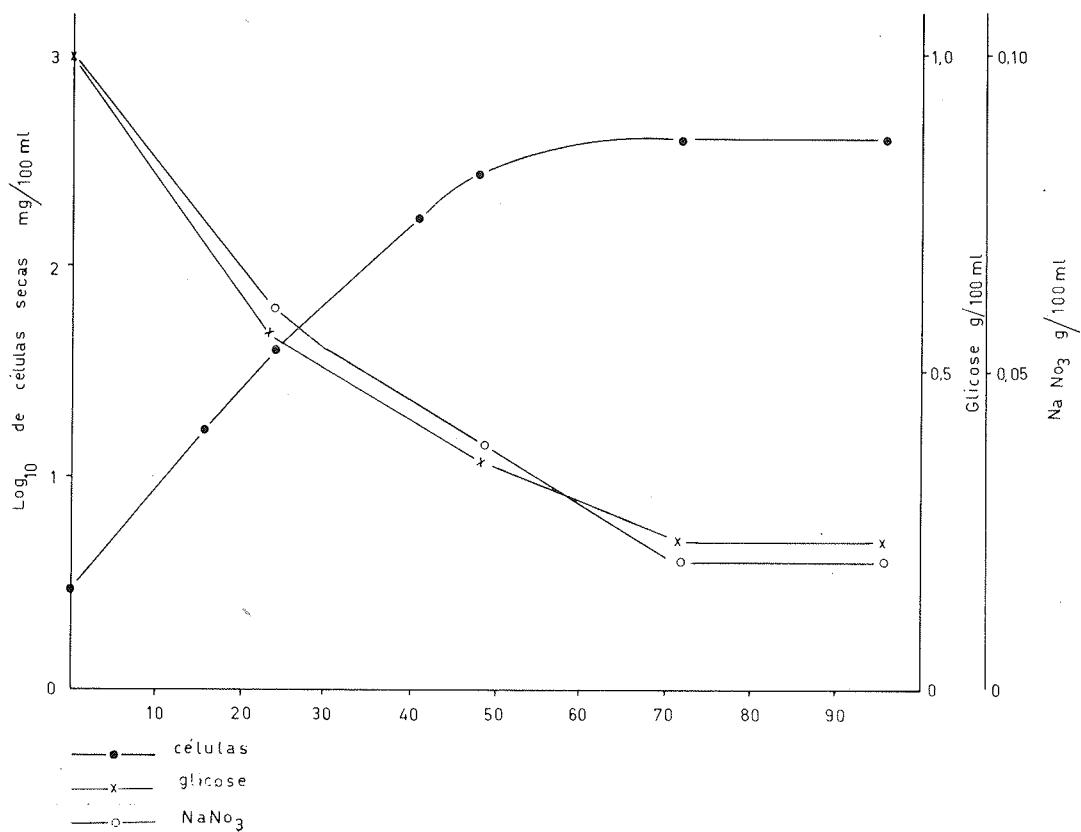
## Resultados e Discussão

A influência da concentração de  $\text{NaNO}_3$ , na produção de biomassa e proteína celular em *Chlorella homosphaera*, está representada na Tabela 1. O consumo de glicose (1% - p/v) e  $\text{NaNO}_3$  (0,1% - p/v), na produção de biomassa de *Chlorella homosphaera*, na fig. 1.

Estudos realizados por Nielsen & Ludin (9), em leveduras, demonstraram que a quantidade de proteínas na célula, depende da concentração de nitrogênio no meio de cultura.

Posteriormente, Miller & col. (7), trabalhando com *Chlorella sorokiniana*, ratificaram esses resultados, obtendo 39,1% de proteínas, usando a concentração de 0,50% (p/v) de  $\text{KNO}_3$ . No presente trabalho, o máximo de biomassa

**Figura 1** — Produção de biomassa de *Chlorella homosphaera*: consumo de glicose e NaNO<sub>3</sub>



**Tabela 1** — Influência da concentração de NaNO<sub>3</sub> na produção de biomassa e proteína celular de *Chlorella homosphaera* com 72 horas de cultivo

NaNO <sub>3</sub> % p/v	Peso seco de células % p/v	Quantidade de proteínas nas células secas. g%
0,06	0,340 <sup>a</sup> ± 0,027 <sup>b</sup>	20,10 <sup>a</sup> ± 0,07 <sup>b</sup>
0,10	0,500 ± 0,015	20,12 ± 0,04
0,12	0,530 ± 0,008	20,22 ± 0,04
0,18	0,530 ± 0,100	24,42 ± 0,08
0,24	0,530 ± 0,010	24,67 ± 0,08
0,50	0,502 ± 0,041	25,57 ± 0,08
1,00	0,460 ± 0,070	27,07 ± 0,08
2,00	0,400 ± 0,004	30,12 ± 0,08
3,00	0,042 ± 0,005	32,67 ± 0,08
4,00	0,042 ± 0,003	40,07 ± 0,08
5,00	0,042 ± 0,003	44,07 ± 0,08

<sup>a</sup> — Média de quatro experimentos

<sup>b</sup> — Desvio padrão da média

foi obtido quando se usou NaNO<sub>3</sub> na faixa de 0,10 — 1,00% (p/v); o aumento da concentração de nitrato no meio de cultura resultou no aumento do conteúdo de proteína na célula.

Witsch (20), trabalhando com *Chlorella* sp., obteve uma produção máxima de biomassa — 0,50% (p/v) de células secas em 20 dias de cultivo. Analisando os resultados de Witsch

(20), embora o mesmo tenha trabalhado em condições fototrófica, torna-se possível, sob certo aspecto, traçar um paralelo com os nossos resultados. Os resultados obtidos neste trabalho — 0,53% (p/v) de células secas com 72h de cultivo — sugerem que a condição mixotrófica proporciona melhor rendimento na produção de biomassa e, considerando principalmente o fator tempo, o seu consequente aproveitamento industrial.

Considerando ainda que o efeito inibidor de NaNO<sub>3</sub> sobre a *Chlorella homosphaera* tornou-se estatisticamente significativo somente a partir de 3,00% (p/v), o que não é fatível para *Chlorella pyrenoidosa* — cujo crescimento torna-se inibido a partir de 1,00% de KNO<sub>3</sub> (8) — conferido àquela alga forte tolerância ao nitrato, torna-a passível de utilização na conversão de resíduos nitrogenados em ração animal.

Ao relacionar a produção de biomassa aos consumos de glicose e nitrato, ocorrido ao nível de 75%, torna-se bioquimicamente compreensível, visto que, a glicose nestas condições de cultivo — mixotrófica — suprime a maior quantidade dos metabólitos intermediários do ciclo de Calvin (3), enquanto o nitrato é utilizado na produção proteica.

## Referências Bibliográficas

1. Coombs, G.E. — Algae (*Chlorella*) as a source of nutrients for the chick. *Science*, 116:453-454, 1952.
2. Fisher, A.W. Jr. & Burlew, J.S. — Nutritional value of microscopic algae, In BURLEW, J.S. (ed). — Algal culture from laboratory to pilot plant. Carnegie Inst., Washington, 1953. p. 303-310.
3. França, F.P. de & Maçaira, L.A. — Influência da concentração de glicose no crescimento de *Chlorella* sp. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.*, 18:69-71, 1976.
4. Geoghegan, M.J. — Unicellular algae a source of food. *Nature*, 168:425-426, 1951.
5. Goldman, J.C.; Kenneth, R.T.; John, H.R. & Corwin, N. — Inorganic nitrogen removal in a combined tertiary treatment — marine aquaculture system. I — Removal efficiencies. *Water Research*, 8:45-54, 1974.
6. Hartel, A.; Fabel-Schulte, K.; Lang, H. & Rick, W. — Eine neue redoxkatalyse für die blützucker bestimzung mit glucose — oxidase. *Klin. Chem. U. Klin. Biochem.*, 6:34-36, 1968.
7. Miller, R.L.; Hazel, E.; Wickline, E. & Richardson, B. — Effects of heterotrophic and autotrophic growth conditions on the composition of *Chlorella sorokiniana*. *J. Food Sci.*, 36:774-777, 1971.
8. Myers, J.; Phillips Jr., J.N. & Graham J.R. — On the mass culture of algae. *Plant Physiol.*, 26:539-548, 1951.
9. Nielsen, N. & Lundin, H. — The amount of some amino acids in proteins-rich and protein-poor — *Rhodotorula gracilis*. *Ann. Acad. Sci. Fennicae*, Ser. A II. Chemical, 60:455-459, 1955.
10. Pratt, R. & Fong, J. — Studies on *Chlorella vulgaris* III. Amer. Jour., Bot., 27:735-743, 1940.
11. Pratt, R. & Johnson, E. — Production of protein and lipid by *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Pharm. Sci.*, 52:979-984, 1963.
12. Reisner, G.; Gering, R.K. & Thompson J.F. — The metabolism of nitrate and ammonia by *Chlorella*. *Plant Physiol.*, 35:48-52, 1960.
13. Schmidt, R.R. — Nitrogen and phosphorus metabolism during synchronous growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Expl. Cell Res.*, 23:209-217, 1961.
14. Schuler, J.F.; Diller, V.M. & Kersten, H.J. — Preferential assimilation of ammonium ion by *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.*, 28:299-303, 1953.
15. Spoehr, H.A. & Milner, H.W. — The chemical composition of *Chlorella*, effect of environmental conditions. *Plant. Physiol.*, 24:120-149, 1949.
16. Stickland, L.D. — The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *J. Gen. Microbiol.*, 5:698-703, 1951.
17. Swann, M.H. & Adams, M.L. — Rapid colorimetric method for nitrates. *Anal. Chem.*, 28:1630, 1956.
18. Toerien, D.F. & Steyn, D.J. — Application of Algal Bioassays in Eutrophication Analyses. *South African J. Scien.*, 69:79-82, 1973.
19. Vanderborgh, N.E. & Archie, G.B. — Phosphate removal by algal systems. *Journal WPCF*, 46:726-734, 1974.
20. Von Witsch, H. — Beobachtungen zur physiologie des Wachstums von *Chlorella* in massenkulturen. *Biolog. Zentralb.*, 67:95-100, 1948.

## **Isolamento e caracterização parcial de um tipo de herpesvírus bovino\***

Fúlvio José Alice\*\*

### **Resumo**

Nove amostras de um vírus foram isoladas de bovinos. Sete foram encontradas no epitélio podal, enviado ao laboratório para diagnóstico de febre aftosa. Outra estirpe foi obtida do pulmão hepatisado de bovino abatido em matadouro e a nona, isolada de um nódulo cutâneo. As propriedades físicas e químicas foram características do grupo dos herpesvírus. Em cultivo de RFB, as amostras produziram ECP semelhante, entretanto, não houve formação de sincícios. Os bezerros, coelhos, cobaia, camundongos adultos e de 0-1 dia de idade e frangos inoculados com o vírus, permaneceram clinicamente normais. O vírus não cresceu, nem produziu lesões em embriões de galinha e não teve atividade hemaglutinante ou hemadsorvente. Sorologicamente, mostrou-se distinto de BHV-1, BHV-2 e PHV-1.

### **Summary**

#### *Isolation and partial characterization of a type of bovine herpesvirus*

Nine strains of a virus were isolated from cattle. Seven were found in foot epithelium submitted to the laboratory for foot-and-mouth disease diagnostic. Another strain was isolated from a hepatised lung of a steer killed at an abattoir, and the ninth was isolated from a skin nodule. The physical and chemical properties were characteristic of the herpesvirus group. The strains produced a similar CPE in BEK culture, but there was no syncytia formation. The calves, rabbits, guinea-pigs, adult and 0-1 day old mice, and cockerels inoculated with the virus remained clinically normal. The virus failed to grow or to produce lesions in chicken embryos, and had no hemagglutination or hemadsorption activity. Serologically the virus was distinct from BHV-1, BHV-2 and PHV-1.

### **Introdução**

Nos últimos anos, têm ocorrido várias adições à lista dos herpesvírus de origem animal. Entre os bovinos, além dos já catalogados (21), foram encontrados outros, que apresentaram características análogas às do grupo herpético. Estes vírus foram isolados de bovinos acometidos por diferentes afecções (10, 15, 16, 19), inclusive de animais cancerosos (9, 12, 20). O significado patogênico dessas estirpes não ficou perfeitamente definido, do mesmo modo ocorrendo com as cepas por nós estudadas.

No presente relato são apresentados os resultados dos estudos sobre o isolamento e caracterização parcial de nove amostras de vírus ori-

ginárias de bovinos, cujas qualidades assemelham-se às do grupo herpético.

### **Material e Métodos**

*Origem e processamento do material* — Nestes estudos, procedeu-se ao exame de diferentes tecidos, colhidos de bovinos, como: epitélios da boca e patas enviados ao laboratório para diagnóstico da febre aftosa, porções de pulmão e raspados de nódulos cutâneos. Depois de lavados com solução fisiológica, os espécimes foram emulsionados na proporção de 10% em meio de manutenção (solução de Earle, com 0,5% de lactalbumina hidrolizada e 0,1% de

\* Trabalho realizado no Instituto Biológico da Bahia, 40.000 Salvador BA

\*\* Escola de Medicina Veterinária. Universidade Federal da Bahia (UFBa.), Salvador, Bahia. Pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq.). Resumo apresentado ao XV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Rio de Janeiro, RJ 25-30 de outubro de 1976.

extrato de levedo — ELL), a emulsão centrifugada a 3.000 rpm, por 30 min a 5°C e o sobrenadante tratado com antibióticos. No caso dos espécimes suspeitos de aftosa, reservavam-se 2-3ml das emulsões antes da adição do clorofórmio, utilizando-se, apenas, os negativos.

*Cultura de tecido* — A preparação das culturas primárias de rim fetal bovino (RFB) seguiram o processo referido anteriormente (2). Os cultivos em garrafas de Roux serviram para culturas secundárias, cujas células foram congeladas a -70°C em meio nutritivo, contendo dimetilsulfóxido. O meio de crescimento dessas células foi o de Johnson & Smith (8). Outros sistemas celulares também foram empregados, como: MDBK e AUBEK, LLC-MK<sub>2</sub> e IB-RS-2 (células renais de bovino, macaco reso e suíno, respectivamente).

*Características físico-químicas* — A sensibilidade do vírus ao éter etílico e ao clorofórmio foi examinada segundo os métodos de Andrews & Horstmann (3) e de Feldman & Wang (7), respectivamente. A atividade ao desoxicolato de sódio foi ensaiada nas diluições a 1:500 e 1:1.000, titulando-se o vírus após 60 min de incubação em banho-maria a 37°C. A estabilidade ao pH 3,0 e ao aquecimento foi determinada pelos métodos descritos anteriormente (2), sendo que, nestes experimentos, a temperatura foi de 56°C, por 30 min. O tipo do ácido nucleico foi determinado, indiretamente, pela 5-iodo-2'-desoxiuridina (IDUR), na concentração de 35 µg/ml, isoladamente, ou em combinação com a timidina, na proporção de 25 µg/ml. Um grupo de tubos previamente lavados com solução de Hank's foi tratado pelo IDUR, por 2h a 37°C, antes da inoculação do vírus (500-1.000 DICT<sub>50</sub>). Depois de 60 min de adsorção o material infectante foi removido, adicionando-se novo meio com IDUR. Outro grupo de tubos, tratado da mesma maneira, recebeu a timidina e todas as culturas foram reincubadas a 37°C, incluindo-se os respectivos controles. Quando o efeito citopático (ECP) atingiu ao máximo nos controles do vírus, as culturas foram congeladas a -70°C. Uma vez descongeladas, foi o material reunido conforme o tratamento, centrifugado para clarificação e o sobrenadante titulado.

*Hemaglutinação e hemadsorção* — As provas de hemaglutinação seguiram o método de Salk (17) e as de hemadsorção, o de Shelokow

& col. (18), empregando-se eritrócitos de coelho, galinha e humano do tipo O. Utilizou-se, como diluente, a solução de Dulbecco, sem os íons Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup> e as leituras foram realizadas depois de 2h de incubação à temperatura ambiente ou em geladeira a 5°C.

*Animais de experimentação e embriões de galinha* — O material infectante foi inoculado pelas vias e doses usuais, em camundongos de 3-4 semanas e de 0-1 dia de idade, cobaias, coelhos e frangos. Em outro experimento, foram utilizados quatro bovinos de 6-8 meses de idade. Um deles recebeu 10ml da suspensão virulenta por via venosa; ao segundo, aplicou-se 3ml por via intradermolingual e 1ml por instilação nos olhos; no terceiro, foram infiltrados 3ml na coroa e espaço interdigital dos cascos dianteiros, praticando-se as injeções no animal anestesiado pelo "Rompum" (Bayer). O último bovino serviu como contacto.

Ovos de galinha embrionados receberam o vírus na membrana alantóide e cavidade alantóica. Grupos de embriões eram sacrificados a intervalos regulares, aproveitando-se os líquidos embrionários e os próprios embriões para inovação em cultivos de RFB.

*Preparação de soros imunes* — Grupos de coelhos, cobaias e frangos foram submetidos a diferentes processos de imunização, injetando-se doses repetidas do material infectante, por diversas vias. Coelhos também foram imunizados pelo método recomendado para preparação de soro anti-poliomielite (13). Doze a 15 dias após a série de inoculações, os animais foram sangrados por punção cardíaca, o soro separado por centrifugação e inativado a 56°C, por 30 min.

*Provas de neutralização* — Nos testes de neutralização adotou-se o método de vírus diluído-soro constante. As misturas soro-vírus foram incubadas por 60 min em banho-maria a 37°C e, então, mergulhadas em banho de água com cubos de gelo. Após 3h, procedeu-se à inoculação em tubos de cultura de RFB, na dose de 0,2ml, utilizando-se dois tubos para cada diluição. Provas de neutralização também foram realizadas com soros imunes contra os vírus da rinotraqueite infecciosa bovina (BHV-1), mamilite bovina (BHV-2) — cepa Sta. 0/700 (2) — e pseudoraiva (PHV-1).

## Resultados

*Isolamento do vírus* — Dos 325 espécimes de epitélio da boca e das patas de bovinos suspeitos de aftosa, cujas provas não confirmaram o diagnóstico daquela virose, foram isoladas sete estirpes de vírus, todas provenientes do tecido podal. Outra amostra foi obtida do pulmão hepátizado de bovino abatido em matadouro e, posteriormente, o exame do tecido de um nódulo cutâneo de outro bovino, revelou nova estirpe. Todos os isolados produziram efeito citopático (ECP) com as mesmas características. Entre 3-7 dias depois da inoculação apareceram células redondas, isoladas, granulosas, mais evidentes na periferia das culturas. Com o prolongamento da incubação, a degeneração estendeu-se, ocasionando completa destruição da cultura e desprendimento das células das paredes do tubo. Nas passagens subseqüentes o ECP foi mais precoce, iniciando-se 36-48 horas após inoculação, pelo aparecimento de pequenos aglomerados de células redondas e a degeneração celular completou-se 2-3 dias depois. Entretanto, não foram observadas formações sincicias.

Preparações fixadas pelo Bouin e coradas pela hematoxilina-eosina revelaram corpúsculos eosinofílicos, intranucleares, do tipo A. Os títulos infectantes variaram de  $10^4$  a  $10^6$ . Nos controles bacterianos não ocorreu desenvolvimento, bem como, em meios especiais, não foi possível comprovar a presença de organismos do grupo PPLO. No caso das amostras provenientes de animais suspeitos de febre aftosa, foram feitas novas provas de fixação de complemento que não confirmaram a presença do vírus aftoso.

Nas culturas celulares de origem bovina, MDBK e AUBEK, ocorreu ECP característico e os títulos foram equivalentes aos verificados em RFB. No entanto, nas linhagens LLC-MK<sub>2</sub> e IB-RS-2 não houve ECP, nem evidência de multiplicação do vírus.

*Características físico-químicas* — A Tabela 1 revela que as estirpes examinadas e o BHV-2 foram particularmente sensíveis ao éter etílico e clorofórmio. O desoxicolato de sódio inativou a estirpe GF-867 e o BHV-2. Por outro lado, os títulos infectantes do vírus PAIN — enterovírus bovino, La Placa tipo I — não foram afetados. As Tabelas 2 e 3 revelam tratar-se de

**Tabela 1** — Efeito do éter etílico, clorofórmio e desoxicolato de sódio sobre a infeciosidade do vírus

Tratamento	Título do vírus em log. <sub>10</sub> DICT <sub>50</sub> /ml							
	GF-812	GF-830	GF-867	GF-1026	PF	JB	BHV-2	PAIN
Éter 20%	Neg	Nt	Neg	Neg	Neg	Nt	Neg	8,0
Controle (MN)	5,5		5,5	5,5	5,0		5,0	7,5
Clorofórmio 5%	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	7,5
Controle (MN)	5,0	4,5	4,5	5,0	5,0	5,0	5,0	7,5
Desoxicolato de sódio								
1:500	Nt	Nt	Neg	Nt	Nt	Nt	Neg	7,5
1:1000	Nt	Nt	Neg	Nt	Nt	Nt	Neg	Nt
Controle (MN)				4,5			5,0	7,0

BHV-2 = Bovídeo herpesvírus 2; PAIN = Enterovírus bovino; Nt = Não testado; Neg =  $< 10^{-1}$ ; MN = Meio nutritivo

**Tabela 2** — Sensibilidade do vírus ao pH ácido

Vírus	Título em log. <sub>10</sub> DICT <sub>50</sub> /ml	
	pH 3,0	MN pH 7,0
GF-812	Neg	4,75
GF-867	Neg	5,0
GF-1026	Neg	6,0
PF	Neg	5,5
BHV-2	Neg	5,5
PAIN	7,5	8,0

Neg =  $< 10^{-1}$ ; BHV-2=bovídeo herpesvírus 2; PAIN = Enterovírus bovino; MN = Meio nutritivo

**Tabela 3** — Sensibilidade ao aquecimento

Vírus	Título em log. <sub>10</sub> DICT <sub>50</sub> /ml	
	30 min 56°C	Não aquecido
GF-812	Neg	5,0
GF-867	Neg	4,5
GF-1026	Neg	5,5
PF	Neg	5,0

Neg =  $< 10^{-1}$

vírus lável, a pH 3,0 e aquecimento a 56°C, por 30 min. A Tabela 4 reúne os resultados das provas com o IDUR e IDUR-timidina. Nota-se que o IDUR, isoladamente, exerceu marcante ação inibidora sobre as amostras e o BHV-2; entretanto, em combinação com a timidina, o efeito foi reverso. O ECP e o título da cepa PAIN permaneceram inalterados.

**Hemaglutinação e hemadsorção** — Pelos métodos empregados, o vírus não mostrou atividade hemaglutinante ou hemadsorvente.

**Animais de experimentação** — Independente mente da espécie, idade, doses e vias de aplicação do material infectante, os animais não revelaram manifestações patológicas que pudessem ser incriminadas ao vírus. Nos embriões de galinha, não ocorreram lesões, assim como foram infrutíferas as tentativas para recuperar o vírus do material embrionário.

**Tabela 4** — Efeito da 5-iodo-2'-desoxiuridina (IDUR) sobre a replicação do vírus

Vírus	Tratamento	ECP	Título em $\log_{10}$ DICT <sub>50</sub> /ml
GF-812	IDUR	—	Neg
	IDUR + timidina	+++	4,0
	Controle (MN)	+++	5,0
GF-830	IDUR	+	1,0
	IDUR + timidina	+++	5,0
	Controle (MN)	+++	6,0
GF-867	IDUR	—	Neg
	Controle (MN)	+++	5,5
GF-1026	IDUR	+	1,0
	IDUR + timidina	+++	5,5
	Controle (MN)	+++	5,5
PF	IDUR	—	Neg
	Controle (MN)	+++	5,0
BHV-2	IDUR	—	Neg
	IDUR + timidina	+++	5,0
	Controle (MN)	+++	5,5
PAIN	IDUR	+++	7,5
	Controle (MN)	+++	8,0

— = ECP não observado; Neg =  $< 10^{-1}$ ; + = Focos ECP não progressivos; ++ = 70-80% destruição celular; +++ = ECP Pleno; BHV-2 = Bovídeo herpesvírus 2; PAIN = Enterovírus bovino; MN = Meio nutritivo

## Discussão

As qualidades físico-químicas das amostras estudadas são análogas às dos herpesvírus. Das nove estirpes isoladas, quatro foram exa-

minadas mais detalhadamente, as quais mostraram-se lábeis ao éter etílico e ao clorofórmio, indicando a presença de lipídio no envoltório do vírus. O desoxicolato de sódio inativou a cepa que foi submetida à prova e o BHV-2, não influindo sobre o enterovírus bovino. O IDUR exerceu particular ação inibidora sobre o ECP e títulos do vírus, cujo efeito foi anulado pela timidina, sugerindo, desta forma, tratar-se de vírus ADN.

Como outros vírus herpéticos, as novas estirpes mostraram-se sensíveis ao pH baixo e ao aquecimento. Nas culturas de RFB, infectadas, foram observados corpúsculos intranucleares eosinofílicos, do tipo A. Todas as amostras produziram ECP com idênticas características e, a despeito das suas analogias com os herpesvírus, não foram observadas formações sinciciais, aspecto que as distingue do BHV-1, BHV-2, BHV-3 (febre catarral maligna) e do vírus de van der Maaten & Boothe (12), isolado de bovinos linfosarcomatosos.

Os atributos citopatológicos desses agentes apresentam certa semelhança com outros (1, 4, 10, 15), particularmente com os herpesvírus não formadores de sincícios, isolados por Rweyemamu & Loretu (16), na Tanzânia. Os referidos autores encontraram quatro amostras do vírus provenientes de material diverso.

Soros imunes contra o BHV-1, BHV-2, BHV-3 e "Movar 33/63" de Bartha & col. (4), não neutralizaram o vírus. Estudos posteriores, confirmaram a sua classificação como herpesvírus (14).

Outros vírus relacionados sorologicamente com o "Movar" foram encontrados em animal com broncopneumonia (6) ou em cultivo de rim bovino que degenerou espontaneamente (5).

Um agente verificado em condições semelhantes, mas relacionado sorologicamente com a cepa "Reims" de Liebermann & col. (10), foi estudado por Luther & col. (11). Estes autores aventam a hipótese de que o vírus por eles isolado possa existir em estado latente, no hospedeiro, por longo período.

Os vírus referidos no presente trabalho não foram neutralizados pelos soros imunes contra o BHV-1, BHV-2 e PHV-1. Os soros dos animais submetidos a diferentes processos de imunização não neutralizaram o vírus homólogo ou outros que foram examinados. Aliás, os mesmos fenômenos ocorreram, também, com os herpesvírus não formadores de sincícios (16). Experimentalmente, não foi possível determinar o significado patológico desses vírus; a

inoculação em animais de laboratório e bezerros não ocasionou processo mórbido aparente, parecendo que se trata de um grupo de herpesvírus órfão.

### Adenda

Enquanto o presente trabalho encontrava-se no prelo, o exame das erosões da gengiva de um bezerro revelou outra amostra de vírus, idêntica às referidas nestes estudos.

### Agradecimentos

Agradecemos aos Drs. C.R. Rossi, (Auburn University, Alabama, USA), R.R. Golgher (UFMG, Belo Horizonte), P. Augé de Mello (Centro Panamericano de Febre Aftosa, Rio de Janeiro) e ao acadêmico de Veterinária, Sr. Helcio Alves de Souza (UFBa., Salvador), pelo fornecimento das linhagens celulares MDBK e AUBEK, timidina, adjuvante oleoso e coleta de material, respectivamente, e a ajuda técnica, ao Sr. Valentim da Silva Carvalho (IBB/EPABA, Salvador).

### Referências Bibliográficas

1. Alexander, R.A.; Plowright, W. & Haig, D.A. — Cytopathogenic agents associated with lumpy-skin disease of cattle. Bull. epiz. Dis. Afr., 5:489-492, 1957.
2. Alice, F.J. — Isolamento do vírus da mamilite herpética bovina no Brasil. Rev. Microbiol., São Paulo 8:9-15, 1977.
3. Andrewes, C. & Horstmann, D.M. — The susceptibility of viruses to ethyl ether. J.gen.Microbiol., 3:290-297, 1949.
4. Bartha, A.; Juhasz, M.; Liebermann, H.; Hantschel, H. & Schulze, P. — Isolierung un eigenschaften eines bovinen herpesvirus von einem kalb mit respiratorischer krankheit und keratokonjunktivitis. Arch.exp.Vet.Med., 21:615:623, 1967.
5. Belak, S. & Palfi, V. — Characterization of a herpesvirus isolated from spontaneous degenerated bovine kidney cell cultures. Acta vet.Acad.Sci.hung., 24:249-253, 1974. In: Vet.Bull., 45:339, 1975, Abst. 2407.
6. Bodon, L.; Kryukov, N.N.; Zudilina, Z.F. & Nadtochei, G.A. — Identification and biological properties of a bovine herpesvirus. Veterinariya, Moscow. 6:33-36, 1971. In: Vet. Bull., 42:76, 1972. Abst. 719.
7. Feldman, H.A. & Wang, S.S. — Sensitivity of various viruses to chloroform. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 106: 736-738, 1961.
8. Johnson, R.H. & Smith, V.W. — The production and use of tissue culture rinderpest vaccine in Nigeria. Bull. epiz. Dis. Afr., 10:417-422, 1962.
9. Kaminjolo, J.S.; Mugera, G.M. & Rosted, A.F. — Isolation of a herpes-type virus from some tumours of bovine origin. Zbl.Vet.Med., 19:626-632, 1972.
10. Liebermann, H.; Schulze, P.; Kokles, R. & Hantschel, H. — Isolierung und identifizierung eines weiteren neuartigen herpesvirus. Arch.exp.Vet.Med., 21:761-776, 1967.
11. Luther, P.D.; Bradley, P.G. & Haig, D.A. — The isolation and characterization of a herpesvirus from calf kidney cell cultures. Res.vet.Sci., 12:496-498, 1971.
12. Maaten, vand der, M.J. & Boothe, A.D. — Isolation of a herpes-like virus from lymphosarcomatous cattle. Arch.ges.Virusforsch., 37:85-96, 1972.
13. Melnick, J.L.; Wenner, H.A. & Rosen, L. — The enteroviruses. In: Lennette, E.H. & Schmidt, N.J. — Diagnostic procedures for viral and rickettsial diseases. 3rd ed. New York, American Public Health Association, 1964.
14. Munz, E; Goebel, E. & Rweyemamu, M.M. — Electron microscopical studies on "non-syncytia forming" bovine herpes viruses isolated in Tanzania. J. comp. Path., 84:485-494, 1974.
15. Parks, J.B. & Kendrick, J.W. — The isolation and partial characterization of a herpesvirus from a case of bovine metritis. Arch.ges.Virusforsch., 41:211-215, 1973.
16. Rweyemamu, M.M. & Loretu, K. — Isolation of "non-syncytia forming" herpes viruses from cattle in Tanzania. J.comp.Path., 83:377-386, 1973.
17. Salk, J.E. — A simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza-virus and the corresponding antibody. J.Immunol., 49:87, 1944.
18. Shelokow, A.; Vogel, J.E. & Chi, L. — Hemadsorption (adsorption-hemagglutination) test for viral agents in tissue culture with special reference to influenza. Proc. Soc.exp.Biol.Med., 97:802-809, 1958.
19. Smith, P.C.; Cutlip, R.C.; Ritchie, A.E. & Young, J.K. — A bovine herpesvirus associated with a disease of the upper respiratory tract of feedlot cattle, J.Am.vet.med.Assoc., 161:1134-1141, 1972.
20. Surin, B.I. & Nadtochei, G.A. — Isolation of a herpesvirus from cows with lymphoid leucosis. Trad. Leucoses of farm animals. Ed. A.A. Polyakov. Moscou. URSS. "KOLOS". 244:49-51, 1975. In: Vet.Bull., 45: 675, 1975. Abst. 5173.
21. Western Hemisphere Committee on Animal Virus Characterization. — An updated listing of animal reference virus recommendations. Am.J.vet.Res., 36:861-872, 1975.

## Propriedades da interferência causada pelo vírus Marituba\*

José Mário S. Mezêncio\*\*  
 Romain Rolland Golgher  
 Maria de Lourdes Petrillo Peixoto\*\*  
 & Paulo César P. Ferreira\*\*\*

### Resumo

A inativação do vírus Marituba pela luz ultravioleta reduziu sua atividade interferente sobre o crescimento do vírus da estomatite vesicular, em fibroblastos de embrião de pinto, quando o período de exposição à luz foi maior que 10 segundos. O aquecimento do vírus a 56°C até 40 minutos (maior tempo investigado), não teve efeito sobre sua capacidade indutora de interferência, embora diminuisse a infetividade em mais de 99,9%. A cinética de estabelecimento desta interferência mostrou que se trata de um fenômeno lento, pois pode ser demonstrado apenas depois de 12 horas de infecção dos fibroblastos de embrião de pinto pelo vírus Marituba. Como a interferência é lenta e o ácido nucléico do vírus é o responsável pela indução, a hipótese mais provável é que se trata de uma interferência por interferon.

### Summary

#### *Properties of interference caused by Marituba virus*

Inactivation of Marituba virus by ultraviolet light diminishes its interfering activity on the growth of vesicular stomatitis virus in chick embryo fibroblasts, when the time of exposure is greater than 10 seconds. Heating the virus at 56°C for periods up to 40 minutes (greater time interval used) although abolishes infectivity more than 99,9% has no effect in the interference-inducing ability of the virus. The kinetics of establishment of the interference shows that the process is slow, because it can be demonstrated only after 12 hours of infection of chick embryo by Marituba virus. Since interference is slow and the viral nucleic acid is the inducer it should be interferon mediated.

### Introdução

A inoculação do vírus Marituba em fibroblastos de embrião de pinto tornou as células resistentes à inoculação posterior com diversos vírus não relacionados, como o vaccínia, o da estomatite vesicular (VSV) e o Sindbis. Células de origem humana ou murina também ficaram protegidas contra a infecção pelo VSV(6,7). Além do vírus Marituba, outros arbovírus do grupo C investigados — os vírus Apeu, Murutucu, Ne-puyo, Oriboca, Itaqui e Caraparu foram capazes de induzir esta interferência em fibroblastos de embrião de pinto e em células aminiotícias humanas de cultivo primário (6,7).

Estes resultados sugeriram tratar-se de interferência mediada por interferon ou com um sítio intracelular de atuação. Neste trabalho, são apresentadas algumas propriedades do fenômeno, a fim de se esclarecer seu mecanismo de ação.

### Material e Métodos

**Células** — Os fibroblastos de embrião de pinto foram preparados conforme a técnica de Henle & col. (9). As células Vero eram multiplicadas em meio 199 com 5% de soro de carneiro, bicarbonato de sódio e antibióticos e o meio de manutenção tinha 1% de soro.

\* Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

\*\* Bolsista do CNPq

\*\*\* Bolsista da CAPES

**Vírus** — Os estoques foram obtidos em células Vero e mantidos a -70°C. O VSV (cepa Indiana), fornecido por Dr. Kurt Paucker, de Filadélfia, EUA, foi titulado, determinando-se o número de unidades formadoras de placa (PFU). Para tal, diluições do vírus foram inoculadas em garrafas de 60ml drenadas com fibroblastos de embrião de pinto. Após a adsorção, as células foram cobertas com meio 199, em concentração dupla, suplementado com vitaminas, bicarbonato de sódio e antibióticos, também em dupla quantidade, misturado com igual volume de ágar a 2%, tudo a 47°C. As garrafas foram incubadas e quando as placas atingiam tamanho apropriado, as células foram fixadas, coradas e feita a contagem das PFU. O vírus Marituba (Be An 15) foi cedido por dr. Francisco de Paula Pinheiro, Belém, PA e sua infetividade medida em células Vero pelo cálculo das TCD<sub>50</sub> (15) como também pela enumeração das PFU, utilizando-se duas garrafas de 60ml por diluição e agarose a 1,8% em substituição ao ágar.

A inativação do vírus Marituba pela luz ultravioleta (UV) foi feita, diluindo-se o vírus em solução de Hanks para dar uma multiplicidade de infecção de 10 (ver adiante) e, em seguida, usando-se aparelho especial, com lâmpada germicida GE ("General Electric", Schenectady, New York, USA) à distância de 19cm de uma plataforma, na qual colocava-se uma placa de Petri, com 10cm de diâmetro, contendo 10ml da suspensão de vírus. A plataforma oscilava, para baixo e para cima, cerca de 80 vezes por minuto, com excursões de 3,5cm.

O tratamento pelo calor foi realizado em banho-maria, a 56°C, após a diluição do vírus como acima, tendo-se o cuidado de homogeneizar-se a temperatura rapidamente, no início da inativação.

**Experimentos de interferência** — As células de duas garrafas de 60ml de fibroblastos de embrião de pinto foram tripsinizadas e contadas em hemacitômetro. Calculava-se a quantidade de vírus a ser adicionada às células — multiplicidade de infecção ( $m$ ) —, levando-se em conta o número de TCD<sub>50</sub> por célula, em 0,4ml. Diluía-se o vírus com meio de manutenção e acrescentava-se esse volume da suspensão a uma garrafa sem meio, utilizando-se duas por grupo. Deixava-se o vírus adsorver durante duas horas, sendo as garrafas agitadas de 30 em 30 minutos. O volume de meio foi aumentado para 6ml, e as células incubadas a 37°C, por 48 horas. Outros períodos de tempo utilizados serão mencionados adiante.

A inibição do crescimento do VSV foi verificada, retirando-se o meio das garrafas e inoculando-se o vírus diluído com meio sem soro, de modo a conter cerca de 100 PFU/0,4ml. O restante do procedimento foi o descrito na determinação das PFU.

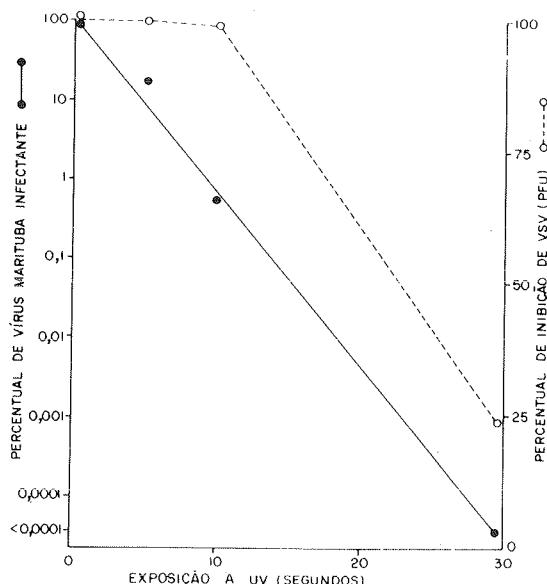
Maiores detalhes dos materiais e métodos podem ser encontrados em outras publicações (6,7).

## Resultados

Estudaram-se, comparativamente, os efeitos da luz ultravioleta na capacidade indutora da interferência e na infetividade do vírus Marituba. O estoque de vírus foi diluído e a suspensão dividida em alíquotas de 10ml; cada uma foi exposta à UV durante determinado tempo, sendo empregados 0; 5; 10 e 30 segundos. Pequeno volume foi retirado, congelado e mantido a -70°C para a medida de infetividade, que foi feita verificando-se o número das PFU sobreviventes. O restante foi imediatamente inoculado em fibroblastos de embrião de pinto, a fim de realizar um experimento de interferência.

Os resultados obtidos estão na Fig. 1. O vírus Marituba teve sua infetividade rapidamente abolida pela UV e a curva formada segue uma equação exponencial. A curva da capacidade de indução da interferência mostra que, até 10 segundos, a inibição causada pelo vírus inativado na formação de placas de VSV não diferiu da-

**Fig. 1** — Inativação do vírus Marituba pela luz ultravioleta. Efeito na infetividade e na capacidade indutora de interferência

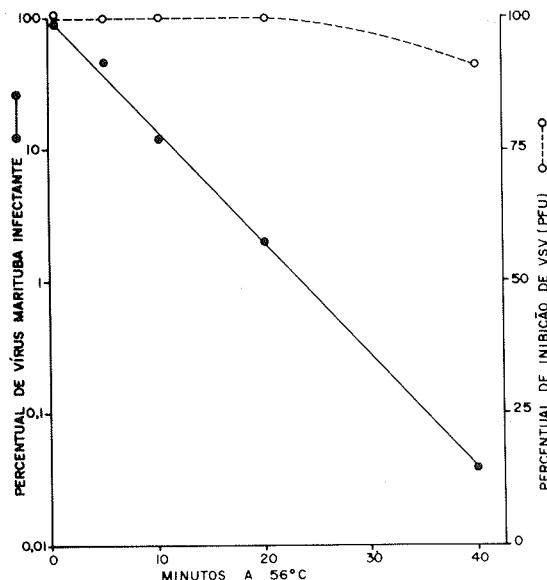


quela do vírus-controle, não submetido à UV. Com exposição mais longa, entretanto, essa capacidade caiu drasticamente, de modo a formar uma paralela à curva de infetividade e, também, de acordo com uma equação exponencial.

Foi examinado como essas duas atividades biológicas do vírus — infetividade e indução de interferência — seriam influenciadas pela sua inativação pelo calor. O vírus estoque foi diluído e manteve-se pequeno volume a 0°C (tempo de tratamento zero). O restante foi colocado a 56°C; depois de 5, 10, 20 e 40 minutos, uma alíquota da suspensão foi retirada e dividida em duas partes. A primeira foi guardada a -70°C para a medida de infetividade e a segunda utilizada para um experimento de interferência conforme detalhado anteriormente.

A exposição do vírus Marituba a 56°C diminuiu sua infetividade exponencialmente, porém sua atividade indutora de interferência permaneceu estável até o mais longo período de tempo empregado, de 40 minutos. O pequeno decréscimo verificado neste último não é significativo (fig. 2).

**Fig. 2** — Inativação do vírus Marituba pelo calor. Efeito na infetividade e na capacidade redutora de interferência



Para se ver ficar a cinética do estabelecimento da interferência, fibroblastos de embrião de pinto foram inoculados com duas doses de vírus Marituba nas multiplicidades de 0,1 e 1,0. Transcorridas 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, as células foram infetadas com o VSV.

A contagem das PFU do vírus-desafio forneceu os dados da Tabela 1. Quando a multiplicidade de infecção foi de 0,1, a interferência só se estabeleceu após 72 horas. Aumentando-se a quantidade de vírus 10 vezes, já se pôde constatar o fenômeno nas 24 horas. Quando as doses de vírus eram pequenas e o tempo de infecção curto, foi observado ligeiro aumento no número de PFU do vírus-desafio, em várias ocasiões, em torno de 20%. Tal "facilitação" ainda não foi convenientemente estudada.

Conclui-se que o estabelecimento da interferência é lento, necessitando de certo número de horas de interação vírus-célula para ser demonstrado.

**Tabela 1** — Cinética da interferência de vírus Marituba na multiplicação de VSV, em fibroblastos de embrião de pinto

Horas de infecção com vírus Marituba	VSV - PFU/garrafa <sup>a</sup> (% do controle)	
	Infecção com vírus Marituba m = 0,1 <sup>b</sup>	m = 1,0
0	100	100
6	>100	>100
12	>100	>100
24	93,4	55,5
48	87,4	SD <sup>c</sup>
72	20,5	1,8
96	5,3	0,5

a — Média de duas garrafas

b — Multiplicidade de vírus Marituba adicionada

c — Sem dado

## Discussão

O exame das curvas da Fig. 1 mostra que para a inativação da infetividade do vírus Marituba bastou um impacto ("hit") por partícula de vírus, de acordo com a teoria do alvo (14); por outro lado, a extrapolação da curva de atividade interferente revela que foram necessários aproximadamente 1000 impactos por partícula, para atingir a área responsável pela interferência. Esta diferença de magnitude talvez esteja ligada à natureza do genoma do vírus, pois foi recentemente comprovado que alguns *Bunyavirus* têm genoma segmentado (2). Também com o vírus influenza, a dose de radiação suficiente para torná-lo não infetante foi muito menor (10).

Embora os efeitos da UV sobre os mixovírus tenham sido amplamente abordados (11), os dados referentes aos arbovírus são escassos. A radiação aboliu o poder indutor de interferência do vírus Mayaro (8), o mesmo acontecendo com o vírus da encefalite do carapato (17). Contudo, o vírus da febre do Colorado, transmitida por carapato, foi capaz de induzir interferon, após o tratamento pela UV (4). Conforme verificamos, a supressão da atividade interferente depende da área-alvo e, em consequência, do tempo de exposição empregado. O vírus Marituba, exposto até 10 segundos, não modificou seu comportamento (Fig. 1) mas se o período de tratamento fosse prolongado, sua capacidade de produzir a interferência caía rapidamente. Os achados conflitantes poderiam ser explicados pela provável diferença existente entre as áreas-alvo dos vírus estudados.

O poder indutor de interferência do vírus Marituba é relativamente resistente a 56°C (Fig. 2) pois o percentual de inibição do VSV permaneceu praticamente inalterado, enquanto a infetividade do vírus reduziu-se em mais de 99,9%. Como o calor age, preferencialmente, nas proteínas do vírion (3), a divergência das curvas sugere a presença de uma proteína essencial à multiplicação do vírus — talvez um enzima associado ao vírion — que não é necessária para a adsorção do vírus, e que é inativada a 56°C.

Os resultados da exposição de outros arbovírus ao calor têm sido discordantes. A inativação por longos períodos, a 37°C, fez com que o vírus da encefalite equina do oeste (WEE) tivesse inibida sua capacidade de causar a interferência via interferon, mas permaneceu sua atividade interferente com o vírus homólogo (13). Entretanto, células de embrião de pinto produziram interferon quando inoculadas com vírus Chikungunya inativado a 35°C (5). Os vírus WEE e Sindbis, submetidos a 37°C, por 10 a 14 dias, induziram interferon em fibroblastos de embrião de pinto, mas não o fizeram em células L (12). Em temperaturas mais elevadas, como a empregada neste trabalho, a inativação do vírus Mayaro a 56°C, durante duas horas, eliminou sua interferência, com o crescimento do vírus Sindbis em fibroblastos de embrião de pinto (8); à mesma temperatura, os vírus WEE e Sindbis tiveram sua atividade indutora de interferon abolida (12) e a 60°C por 15 minutos, o vírus da febre do Colorado, transmitida por carapatos, teve sua infetividade e ação indutora de interferon reduzidas (4). As discrepâncias entre estes dados e os por nós encontrados talvez pos-

sam ser explicadas pelas diferenças existentes nas próprias partículas dos vírus ou nos sistemas empregados; mas como a inativação do vírus Marituba reduz a população de vírus infectante de mais de 99,9% e o vírus multiplica-se em fibroblastos de embrião de pinto, atingindo baixo título (Golgher, R.R. e Mezêncio, J.M.S., dados não publicados), isto implica que o vírus inativado a 56°C, embora não se multiplique, induz a interferência.

A cinética do estabelecimento da interferência (Tabela 1) indicou que o processo é lento, pois esta só apareceu após 24 horas de interação vírus-célula, com o vírus indutor na multiplicidade de infecção de 1,0. Experimento realizado com dose maior do vírus Marituba ( $m = 10$ ) mostrou que a interferência já podia ser vista 12 horas após a infecção (não ilustrado). Existe, portanto, uma relação entre a dose e a cinética de interferência, nas quantidades de vírus Marituba utilizadas. Não sabemos se a interferência seria iniciada mais cedo, caso a infecção fosse feita com multiplicidades ainda maiores, pois era muito freqüente a degeneração dos fibroblastos nestas condições.

Os dados obtidos revelam que a interferência é lenta e que a parte do vírus Marituba responsável pelo seu estabelecimento é o ácido nucléico. A possibilidade de interferência por componente estrutural do vírion (1) fica praticamente afastada, pois dificilmente uma endonuclease presente no vírion é indutora da interferência resistiria ao aquecimento a 56°C por 40 minutos. Ademais, nesta interferência, os dois vírus são inoculados a um só tempo nas células; isto também elimina a hipótese de uma interferência intrínseca (16).

O mecanismo de ação mais provável é o de uma interferência por interferon. Resultados preliminares indicam a existência de um fator extravírico, nas culturas de fibroblastos de embrião de pinto infetadas com vírus e que deverá ser caracterizado.

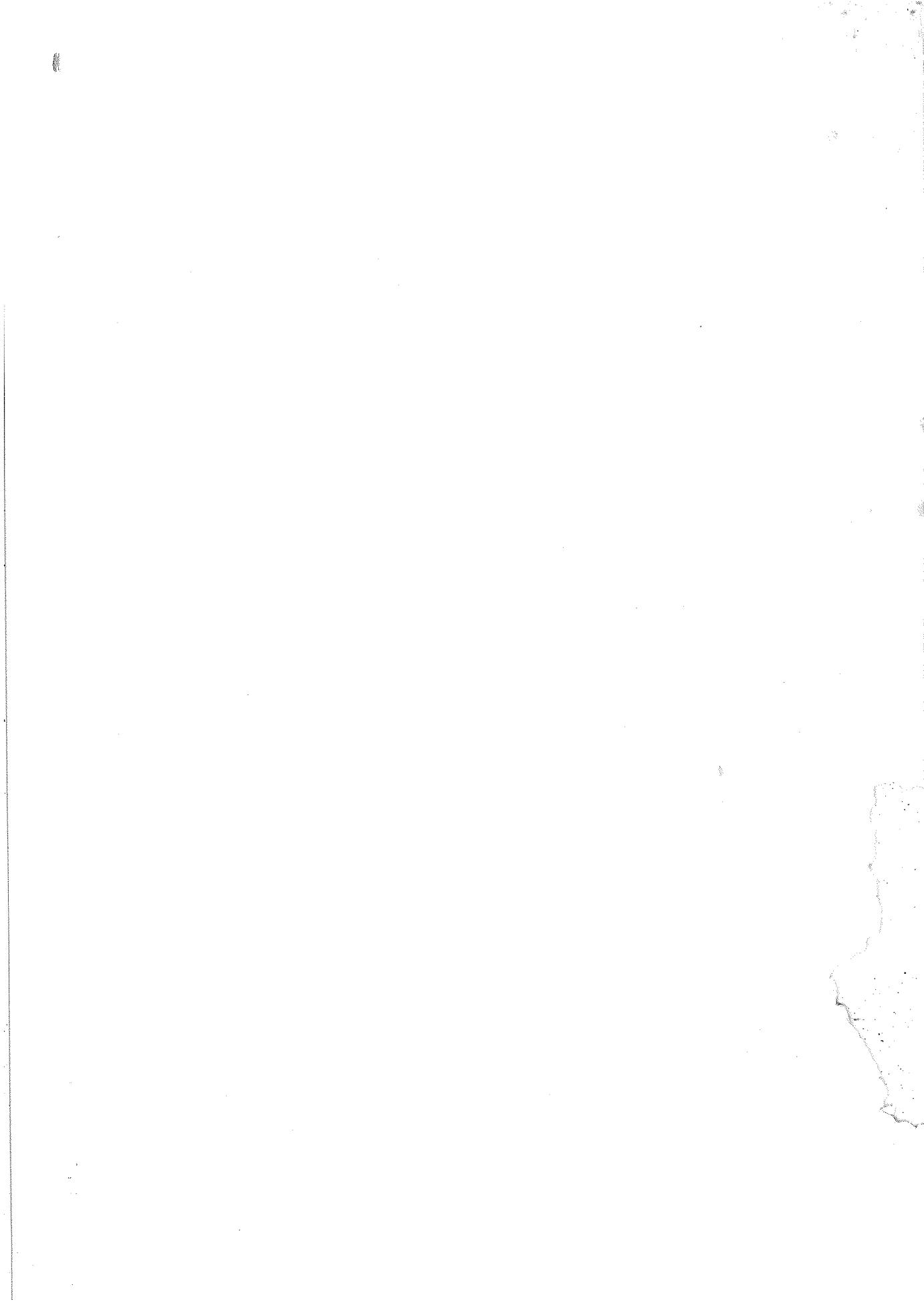
## Agradecimentos

Este trabalho recebeu auxílio do CNPq (TC 15.926), Conselho de Pesquisas da UFMG, CAPES e Convênio BNDE/Funtec 132. João Rodrigues dos Santos, Maria Lúcia Trindade e Bernadete de Jesus Martins colaboraram com eficiência e boa vontade na execução técnica. Os autores agradecem ao dr. Enio Cardillo Vieira a revisão do trabalho.

## Referências Bibliográficas

1. Barzilai, R.; Finkelkraut, E.; Lazarus, L.H. & Goldblum, N. — Inhibition of simian virus 40 DNA synthesis by frog virus 3. *J. Gen. Virol.*, 23:335-339, 1974.
2. Clewley, J.; Gentsch, J. & Bishop, D.H.L. — Three unique viral RNA species of snow-shoe hare and La Crosse bunyaviruses. *J. Virol.*, 22:459-468, 1977.
3. Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S. & Wood Jr., W.B. — *Microbiology*. New York, Harper & Row, 1967.
4. Dubovi, E.J. & Akers, T.G. — Interferon induction by Colorado tick fever: a double stranded RNA virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 139: 123-127, 1972.
5. Gifford, G.E. & Heller, E. — Effect of actinomycin D on interferon production by "active" and "inactive" Chikungunya virus in chick cells. *Nature*, 200:50-51, 1963.
6. Golgher, R.R. — Interferência por arbovírus do grupo C. Tese. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1975.
7. Golgher, R.R.; Mezêncio, J.M.S.; Ferreira, P.C.P. & Petrillo Peixoto, M.L. — Interferência causada por arbovírus do grupo C. *Rev. Microbiol.*, 9(3) no prelo, 1978.
8. Henderson, J.R. & Taylor, R.M. — Studies on mechanisms of arthropod-borne virus interference in tissue culture. *Virology*, 13:477-484, 1961.
9. Henle, G.; Deinhardt, F.; Bergs, V.V. & Henle, W. — Studies on the persistent infections of tissue cultures. I — General aspects of the system. *J. Exp. Med.*, 108: 537-560, 1958.
10. Henle, W. & Henle, G. — The effect of ultraviolet irradiation on various properties of influenza viruses. *J. Exp. Med.*, 85:347-364, 1947.
11. Ho, M. — Animal viruses and interferon formation. In: *Interferons and interferon inducers*. p. 29-44. Finter, N.B., Amsterdam, North Holland Publishing, 1973.
12. Le Clerc, J.L. & Cogniaux-Le Clerc, J. — The production of interferon by two inactivated arboviruses. *Acta Virol.*, 9:18-24, 1965.
13. Lockart Jr., R.Z. — Production of an interferon by L cells infected with Western equine encephalomyelitis. *L. Bacteriol.*, 85:556—566, 1963.
14. Luria, S.E. & Darnell Jr., J.E., — *General Virology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, John Wiley & Sons, 1967.
15. Reed, L.J. & Muench, H. — A simple method of estimating fifty percent end-points. *Amer. J. Hyg.*, 27:493-497, 1938.
16. Rott, R.; Scholtissek, C.; Klenk, H.D. & Kaluza, G. — Intrinsic interference between different enveloped RNA viruses. *J. Gen. Virol.*, 17:255-264, 1972.
17. Vilcek, J. — Studies on an interferon from tick-borne encephalitis virus-infected cells (IF). I — Appearance of IF in infected chick embryo cell cultures. *Acta Virol.*, 5:278-282, 1961.





**E A. FABRICAÇÃO  
DE ARTIGOS PARA  
LABORATÓRIOS LTDA.**

**INTERLAB**  
**DIFCO  
LABORATORIES**

**Meios de Cultura, antisoros, disco de sensibilidade,  
reagentes diagnósticos, corantes.**

**SIGMA**  
Produtos Bioquímicos

**NER**  
metros de chama  
electrofotômetros  
côômetros

**NSIDYNE**  
citômetros

**HERWOOD**  
Sistema Monoject,  
Agulhas, Paraplast,  
Coagulyzer

**'E NUCLEUS**  
Chama Counters

**RLECO S/P**  
Acessórios e aparelhos

**S**  
el de filtro

**MARNSTEAD**  
Água Deionizada Qualidade Reagente.  
Liquidação

**ROBIOLOGICAL ASS.**  
de vírus e globulinas marcadas

**TONA**  
Urinômetros, refractômetros

**CSM**  
Meios anaeróbios pré-reduzidos

**NUCLEPORE**  
Membranas filtrantes

**PROPPER**  
Lâminas, lamínulas, Pipetas  
glób. brancos e vermelhos

**IBL**  
Kit de toxoplasma e criptococos

**HYCEL**  
Contadores automáticos de células,  
Kits

**COLEMAN**  
Espectrofotômetros

**CLAY ADAMS**  
Contadores de células, Centrífugas

**InLAB** (Produção própria)  
Bacti-Swabs, Uro-Dips, Lancetas,  
Capilares, Agulhas, Detergentes

**DRUCKER**  
Centrífugas refrigeradas

**OHAUS**  
Balanças para laboratórios e indústrias

**PRODUTOS QUÍMICOS**  
MCB, Aldrich, Pfaltz & Bauer, InLAB, BDH,  
Fluka, Baker, Detergentes biodegradáveis

**CULTURETTES**  
Transporte de amostras  
bacteriológicas

**IL**  
Analisadores de Gases

**OXFORD**  
Imunodifusão, Pipetadores,  
Diluidores, Kits p/T4, Cálculo Urinário,  
Bicarbonato

**WELLCOME**  
Antígenos e antisoros

**PFIZER**  
Antigex-Hepatitis em 4 minutos

**GAS PAK**  
Jarras e componentes

**FLOW**  
Meios p/ cultura de tecidos, Antígeno  
Rubella, Equipamento p/ microtitulação

**SWIFT**  
Microscópios estéreo,  
Binocular Koehler,  
de imunofluorescência.

**LIVROS TÉCNICOS**  
Novidades em microbiologia,  
imunologia, bioquímica, eletroforese

**ASSISTÊNCIA TÉCNICA**

Conserto e manutenção de aparelhos para  
laboratórios. Peças originais.