

Volume 9 Número 3 Jul.-Set. 1978

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

São Paulo — Brasil

Revista de
Microbiologia

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^a 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 ($\mu\mu$) e micromico ($\mu\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm ; 10^{-6}m), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm ; 10^{-9}m), ao invés de milímicro ($\mu\mu$); e Angstroms (\AA ; 10^{-10}m). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ou microlitros por litro ($\mu\text{l}/\text{litros/litro}$). 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^a 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 e minúsculas normalmente usadas e (ii) 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 seção **Referências Bibliográficas**, as citações devem ser por ordem alfabética de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas sequencialmente. Os artigos em periódicos devem ser citados na seguinte ordem: nome(s) do(s) autor(es) em maiúsculas e minúsculas, título do trabalho, nome do periódico (abreviado de acordo com o World Medical Periodicals), número do volume, número do fascículo (quando desejado; colocado entre parênteses), número da primeira e da última página do artigo, e ano da publicação.

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

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

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

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

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

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

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

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

SEPARATAS — Serão fornecidas, gratuitamente 50 separatas por artigo. Para encomendas maiores, o(s) autor(es) deve(m) entrar em entendimento com o Diretor Executivo, correndo as despesas por conta dos interessados.

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 9

Julho-Setembro 1978

Número 3

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 9 (3)

CONTEÚDO

Romain Rolland Golgher José Mário S. Mezêncio Paulo César P. Ferreira & Maria L. Peixoto	103	Interferência causada por arbovírus do grupo C	Interference caused by group C arboviruses
D.P. Falcão W.H. Ewing B.R. Davis & G.J. Hermann	109	Caracterização bioquímica de <i>Yersinia enterocolitica</i> e de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	A biochemical characterization of <i>Yersinia enterocolitica</i> and <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
Laerte de Andrade & L. Palhano Júnior	122	Interferência do radical nitrito na pesquisa da niacina em culturas de micobactérias	Nitrite radical as interferent in niacin research in mycobacterial cultures
Leila S. Fonseca & Paulo P. Gontijo Filho	125	<i>Micobactérias atípicas isoladas de material humano na cidade do Rio de Janeiro.</i> <i>I — Identificação preliminar pela morfologia colonial</i>	<i>Atypical mycobacteria isolated from human sources in Rio de Janeiro.</i> <i>I — Preliminary identification by colony characteristics</i>
Ivone Rocco Suassuna José Renaldi F. Brito Ítalo Suassuna & Rosa Maria C. Ferreira	131	<i>Comportamento bioquímico de amostras de <i>Citrobacter diversus</i> (<i>Levinea malonatica</i>) e <i>Levinea amalonatica</i> isoladas de material clínico humano</i>	<i>Biochemical behavior of <i>Citrobacter diversus</i> (<i>Levinea malonatica</i>) and <i>Levinea amalonatica</i> isolated from human's clinical samples</i>
J. P. Siqueira Júnior & J.L. Azevedo	137	<i>Efeito do brometo de etídio em amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a drogas</i>	<i>Effects of ethidium bromide in drug resistant strains of <i>Staphylococcus aureus</i></i>
C.P. Mendonça & C. Solé-Vernin	142	<i>Infecções hospitalares causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> e seus respectivos fagótipos</i>	<i>Hospital infections caused by <i>Staphylococcus aureus</i> and their respectives phagotypes</i>
Leila S. Fonseca & Paulo P. Gontijo Filho	149	<i>Micobactérias atípicas isoladas de material humano na cidade do Rio de Janeiro.</i> <i>II — Identificação bioquímica e espectro de resistência aos tuberculostáticos</i>	<i>Atypical mycobacteria isolated from human sources in Rio de Janeiro.</i> <i>II — Bacteriological study and drug susceptibility test</i>
J.C. da Silva & J.L. de Azevedo	156	<i>Radiação gama e instabilidade em <i>Aspergillus niger</i></i>	<i>Gamma-rays and instability of <i>Aspergillus niger</i></i>
R.M. Attia Rawia F. Gamal & A.M. Dokhan	159	<i>Cinética da alfa amilase fúngica solúvel de <i>Aspergillus niger</i></i>	<i>Kinetic behavior of soluble fungal alpha amylase from <i>Aspergillus niger</i></i>
E.F. Rodrigues de Oliveira Elizabeth A. Marques & Ítalo Suassuna	163	<i>Ocorrência de grupos sorológicos de <i>Escherichia coli</i> na flora intestinal</i>	<i>Serogroups of intestinal <i>Escherichia coli</i></i>
C.F. Fontes M.R.F. Toledo M.H.L. Reis J. Murahovschi & L.R. Trabulsi	167	<i>Isolamento de uma amostra de <i>Yersinia enterocolitica</i> das fezes de uma criança, na cidade de São Paulo</i>	<i>Isolated strain of <i>Yersinia enterocolitica</i> from feces of a child in São Paulo City, Brazil</i>

CONTENTS

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Sócios Patrocinadores

BIOLAB-MÉRIEUX — Produtos para Laboratórios Ltda.

Eli Lily do Brasil Ltda.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

Coca-Cola Indústrias Ltda.

Interferência causada por arbovírus do grupo C*

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

Resumo

A infecção prévia de fibroblastos de embrião de pinto com o vírus Marituba tornou as células resistentes aos vírus vaccinia, Sindbis e o da estomatite vesicular (VSV). O vírus Sindbis foi o mais sensível ao efeito, seguindo-se o VSV; o vírus da doença de Newcastle não foi inibido em seu crescimento. Outras células, como as amnióticas humanas primárias e a linhagem contínua L-A9 de camundongos, infetadas com o vírus Marituba, também adquiriram esse estado de resistência anti-vírica.

Além do vírus Marituba, os vírus Apeu, Murutucu, Nepuyo, Oriboca, Caraparu e Itaqui foram capazes de induzir a interferência. Os vírus Apeu, Murutucu, Nepuyo e Oriboca foram fortemente interferentes e os vírus Caraparu e Marituba, fracamente ativos. O vírus Itaqui provavelmente ocupa uma posição intermediária. Em células amnióticas humanas de cultivo primário, os vírus assinalados também mostraram a mesma atividade. O mecanismo de ação desta interferência ainda é desconhecido. Pelo conhecimento atual das interferências causadas por vírus animais e as características que descrevemos ou seja — (i) ser induzida por vários componentes do grupo C; (ii) ser possível demonstrá-la em cultivos celulares de diversas espécies animais e sobretudo (iii) impedir o crescimento de vários vírus não relacionados — verifica-se que a interferência não é ao nível dos receptores celulares, ou na penetração do vírus-desafio. Não se trata de interferência por partícula deficiente. Deve ser um fenômeno mediado por interferon ou atuante em alguma fase da multiplicação intracelular dos vírus.

Summary

Interference caused by group C arboviruses

Previous infection of chick embryo fibroblasts with Marituba virus rendered the cells resistant to the challenge with vaccinia, Sindbis and vesicular stomatitis (VSV) viruses. Sindbis virus was very sensitive, VSV was moderately sensitive and Newcastle disease virus was not inhibited in its growth in Marituba-infected cells. When primary human amniotic cells and murine L-A9 line were infected with the same virus, they also showed resistance against virus challenge. Besides Marituba virus, Apeu, Murutucu, Nepuyo, Oriboca, Caraparu and Itaqui viruses have also shown to be interference inducers. Apeu, Murutucu, Nepuyo and Oriboca viruses were good inducers whereas Caraparu and Marituba viruses displayed low activity. Itaqui virus has probably moderate activity. In primary human amniotic cells the mentioned viruses had the same activity. The interfering mechanism of action is still unknown. From the present knowledge of animal virus interferences and because of its characteristics — (i) several members of group C arboviruses are able to induce it; (ii) it is possible to demonstrate it in tissue culture derived from many species and more important (iii) it hampers the growth of unrelated viruses — it can be implied that this interference is not acting at receptor or penetration sites and neither caused by defective virus particles. It should be interferon-mediated or act in an intracellular step of virus multiplication.

Introdução

Os arbovírus do grupo C foram isolados primeiramente na região amazônica (4) e atualmente são classificados na família *Bunyaviridae*

(7). As atividades biológicas "in vitro" desse grupo de vírus são pouco conhecidas (8, 12). A exemplo de diversos outros arbovírus, que apresentam uma marcada atividade de interferência, como os componentes dos gêneros *AI-*

* Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 30000 Belo Horizonte, MG

** Bolsista do CNPq

*** Bolsista da CAPES

phavirus e Flavivirus (10), resolvemos esclarecer o papel dos arbovírus do grupo C neste fenômeno.

Material e Métodos

Células — Os fibroblastos de embrião de pinto foram obtidos conforme a técnica de Henle & col. (9). Embriões de pinto com 10 dias foram removidos do ovo, lavados em salina de Hanks e foram retirados seus membros e cabeças; o restante foi então fragmentado por extrusão em uma seringa de 10 ml. Os fragmentos foram tratados por tripsina a 0,25% (em solução de Hanks) por 30 min. O líquido foi decantado após 10 min. de repouso e o sobrenadante foi filtrado em gaze, centrifugado a $500 \times g$ a 4°C , durante 10 min. As células do sedimento foram ressuspensas em meio A — meio 199 com bicarbonato de sódio 0,15%, soro de carneiro inativado 5%, e antibióticos (10.000 U de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 0,25 mg de anfotericina B por 100 ml) — para dar uma concentração celular de 1,5 milhão por ml. Esta suspensão foi distribuída a garrafas de 60 ml, recebendo 5,5 ml cada uma, e as células empregadas em dois a três dias. Para a manutenção, o meio tinha reduzida a quantidade de soro para 1% (meio B).

Células amnióticas humanas de cultivo primário foram preparadas de acordo com Schmidt (16). O âmnio de placenta proveniente de cesariana foi separado, cortado em pequenos fragmentos, lavado em solução de Hanks e transferido para um frasco com solução de tripsina (0,25%) a 37°C . Depois de uma hora à temperatura ambiente, a tripsina foi desprezada e substituída por igual volume da solução. A membrana foi agitada durante 45 min., o sobrenadante foi colhido e centrifugado a $500 \times g$, a 4°C , durante 10 min, sendo essa operação repetida três a quatro vezes. A concentração das células do sedimento foi ajustada com meio de crescimento (solução salina de Scherer (15) 55 ml; meio 199, 25 ml; soro de carneiro inativado 20 ml e antibióticos) para 0,5 milhão por ml e distribuída-se 1 ml por tubo 16×160 . O meio de crescimento foi trocado cada três a quatro dias e as células estavam prontas para uso 10 a 12 dias após o implante. A quantidade de soro, no meio de manutenção, foi de 2%.

As células Vero (17) derivadas de rim de *Cercopithecus aetiops*, foram fornecidas pela American Type Culture Collection, Rockville,

Maryland, EUA e subcultivadas um número desconhecido de vezes em meio A. As células foram repicadas duas vezes por semana, com o auxílio de tripsina a 0,25%, de uma garrafa de 500 ml, para duas ou três garrafas iguais, contendo 30 ml de meio cada. Posteriormente, empregaram-se garrafas de 500 ml redondas, semeadas com 4 milhões de células, em um total de 80 ml de meio e incubadas em um tambor com 12 rotações por hora. Os tubos 16×160 foram preparados com um implante de 150 a 200 mil células em 1,0 ml e ficavam prontos para uso daí três a quatro dias. O meio de manutenção foi o meio B.

Vírus — O vírus vaccínico era originário de uma vacina antivariólica preparada no Estado de Massachussets, EUA e foi multiplicado uma vez em células HeLa e células Vero. O vírus da doença de Newcastle (NDV), cepa Victoria, assim como o vírus da estomatite vesicular (VSV), amostra Indiana, foram cedidos pelo dr. Kurt Paucker, de Filadélfia, EUA. O primeiro foi mantido por passagens em ovo embrionado e o VSV inoculado uma vez em fibroblastos de embrião de pinto e em células Vero. O dr. Norman B. Finter, de Macclesfield, Inglaterra, forneceu a amostra de vírus Sindbis, que sofreu duas passagens em células HeLa e uma em células Vero antes de ser empregado. Dos arbovírus do grupo C, o vírus Marituba (Be An 15) foi uma cortesia do dr. Francisco de Paula Pinheiro, de Belém, PA e foi objeto de três passagens em camundongo neonato, em células HeLa e em células Vero. Os restantes — Oriboca (Be An 17); Murucutu (Be An 974), Caraparu (Be An 3994); Itaqui (Be An 12797); Apeu (Be An 848) e Nepuyo (Be An 10709) foram supridos pela American Type Culture Collection e cultivados em células HeLa ou Vero em um número de passagens não superior a três.

Os estoques de vírus foram preparados em células Vero, e mantidos a -70°C . O NDV, entretanto, foi crescido em ovo embrionado e o fluido alantóico mantido a 4°C . A contaminação por fungos e bactérias foi testada em todas as preparações de vírus, em meio de tioglicolato. A pesquisa de micoplasma foi feita nos estoques de vírus Marituba e Oriboca, em meio de cultura apropriado, incubando-se os repiques por três semanas, com resultados negativos.

Para a titulação dos arbovírus do grupo C, os estoques foram diluídos em série de 10 e inoculados em tubos de células Vero, com meio B,

utilizando-se cinco tubos por diluição. Durante a incubação a 37°C, quando o efeito citopático não se alterava, calculava-se a dose infetante para 50% das culturas de tecido (TCD_{50}) pelo método de Reed & Muench (13). A titulação do VSV em células amnióticas foi realizada da mesma forma.

A determinação das unidades formadoras de placa (PFU) foi realizada em garrafas de 60 ml com fibroblastos de embrião de pinto. O meio foi desprezado e as células infetadas com 0,4 ml de diluição do vírus. Após a adsorção por uma hora a 37°C, meio 199, em concentração dupla, com vitaminas 0,08%, soro de carneiro inativado 20%, bicarbonato de sódio 0,22% e antibióticos, foram misturados em igual volume com uma solução de agar a 2%, ambos a 47°C. Cada garrafa recebia 7 ml desta mistura e, depois da solidificação do meio, as garrafas foram incubadas a 37°C, e quando o tamanho das PFU alcançava 3 mm, as células foram fixadas com formol a 20% por duas horas, o meio foi retirado e a monocamada corada com cristal violeta a 1%, em solução contendo 20% de etanol. No caso do vírus vaccínia, após sua adsorção, colocavam-se 6 ml de meio B em cada garrafa. Depois de 48 horas de infecção a 37°C, o meio foi desprezado e as células fixadas e coradas.

Experiências de interferência — As células de duas garrafas ou quatro tubos foram contadas e calculava-se a quantidade de vírus a ser adicionada às células (multiplicidade de infecção — m), levando-se em conta o número de TCD_{50} por célula. O vírus foi diluído em meio de manutenção e acrescentaram-se 0,4 ml a garrafas drenadas de embrião de pinto (duas para cada grupo) ou, para as outras células, 0,1 ml em cada tubo, também sem meio. A adsorção de vírus foi realizada em duas horas, a 37°C, as garrafas sendo agitadas de 30 em 30 min. e os tubos colocados em um tambor rolante com 12 rotações por hora. O volume de meio foi aumentado para 6 ml (garrafas) e 1 ml (tubos) e as células reincubadas por 48 horas, sendo os tubos recolocados no tambor rolante.

A inibição de crescimento do segundo vírus (vírus-desafio) foi verificada nas garrafas, retirando-se o meio e inoculando-se o vírus diluído para conter aproximadamente 100 PFU em 0,4 ml. A manipulação posterior está detalhada acima, na determinação das PFU. Aos tubos, após ter sido desprezado o meio, adicionavam-se aproximadamente 100 TCD_{50}

do vírus-desafio em 1,0 ml de manutenção. Esta suspensão foi retitulada novamente na ocasião da experiência.

Outros materiais — O meio 199, solução de Scherer, tripsina, agar ("Bacto-agar"), vitaminas ("Bacto TC vitamins minimal Eagle") e o soro fetal bovino eram originários da Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA. Sais e corante foram adquiridos da E. Merck, Darmstadt, Alemanha. Os antibióticos da Squibb Indústria Química, Santo Amaro, SP. Os ovos embrionados foram conseguidos da SOMAI, Belo Horizonte, e o soro de carneiro de matadouro local.

Resultados

Fibroblastos de embrião de pinto foram inoculados com o vírus Marituba em diferentes multiplicidades de infecção. Decorridas 48 horas de infecção, o meio das garrafas foi retirado e as células infetadas com vírus vaccínia, para a realização de uma experiência de interferência, conforme detalhado em Material e Métodos. Como se pode ver na tabela 1, quando a relação vírus adicionado/célula foi de 1/25 ou 1/250 a inibição do aparecimento das PFU do vírus vaccínia foi evidente, caracterizando um fenômeno de interferência.

Tabela 1 — Interferência de vírus Marituba na multiplicação de vírus vaccínia, em fibroblastos de embrião de pinto

Vírus Marituba ^a m ^b (x 10 ⁻⁴)	Vírus vaccínia PFU/garrafa ^c
400	0
40	7
4	SD ^d
0,4	72
Controle	70

a — Infecção das células por 48 horas

b — Multiplicidade de vírus adicionada

c — Média de duas garrafas

d — Sem dado

A fim de se verificar se esta interferência poderia inibir o crescimento de outros vírus, realizou-se uma série de experimentos em fibroblastos de embrião de pinto. As células foram primeiramente infetadas com o vírus Marituba e mais tarde com os vírus-desafio VSV, Sindbis e NDV. Consultando a tabela 2, nota-se que o VSV e o vírus Sindbis tiveram sua multiplicação inibida pela infecção prévia pelo vírus Marituba.

Tabela 2 — Interferência de vírus Marituba na multiplicação de diversos vírus, em fibroblastos de embrião de pinto: efeito de diferentes doses

Vírus Marituba ^b m ^c	PFU/garrafa ^a (% do controle)		
	VSV	Sindbis	NDV
100	2	0	89
10	28	0	87,5
1	56	19,5	SD ^d
0,1	84	94	SD

a — Média de duas garrafas

b — Infecção das células por 48 horas

c — Multiplicidade de infecção adicionada

d — Sem dado

Nas multiplicidades de infecção utilizadas, não foi possível verificar redução no crescimento do NDV, pois os dados apresentados estão no limite do erro experimental da titulação das PFU (6).

A possibilidade de provocar a interferência pela infecção do vírus Marituba em outras células foi investigada. Células amnióticas humanas e cultivo primário foram infetadas com duas concentrações do vírus, empregando-se dois tubos por concentração; depois da primeira incubação a 37°C, acrescentaram-se, a cada tubo, aproximadamente 100 TCD₅₀ do VSV. A leitura do efeito citopático do VSV, depois de quatro dias de infecção, revelou os dados organizados na tabela 3. Da mesma forma que o já

Tabela 3 — Interferência, em células amnióticas humanas primárias infetadas com vírus Marituba, na multiplicação de VSV

Vírus Marituba ^a m ^b	Efeito citopático VSV ^c	
	0,1	0,01
Controle		4,3

a — Infecção celular por 48 horas

b — Multiplicidade de vírus adicionada

c — Dose de VSV — 100 TCD₅₀. Leitura após quatro dias de infecção com VSV

relatado, o efeito citopático do vírus-desafio foi refreado pela infecção das células pelo vírus Marituba. Em células da linhagem contínua L-A9, de camundongo, gentilmente cedidas pelo dr. Mário Vasco Fernandes (Rio de Janeiro) e manipuladas do mesmo modo que as células amnióticas, a interferência do vírus Marituba sobre a manipulação do VSV também pode ser demonstrada (não ilustrado).

Procurou-se pesquisar se a interferência seria uma propriedade somente do vírus Marituba ou se outros arbovírus do grupo C poderiam produzi-la, assim como comparar a eficiência de diversos componentes do grupo C em fazer seguir a inibição no crescimento do VSV. Desta forma, infetaram-se fibroblastos de embrião de pinto com os vírus Apeu, Marituba, Murutucu, Nepuyo e Oriboca, com multiplicidades de infecção adicionadas de 1,0; 0,01 e 0,001; foram usadas com os vírus Itaqui e Caraparu apenas as últimas doses. Posteriormente, as células foram inoculadas com o VSV. Após fixação e coloração, a contagem das PFU forneceu os dados mostrados na tabela 4. Todos os arbovírus testados foram capazes de induzir a interferência. Na infecção com o vírus Caraparu, embora a inibição do VSV tenha sido muito ligeira, ou seja, de 19%, o valor obtido está fora do erro experimental da dosagem das PFU. Pode-se separar os vírus em grupos: fortemente interferente — Apeu, Murutucu, Nepuyo e Oriboca; fracamente interferente — Caraparu e Marituba. Os dados disponíveis não permitem uma classificação segura do vírus Itaqui, embora sejam sugestivos de que ocupe uma posição intermediária.

Tabela 4 — Interferência por arbovírus do grupo C, em fibroblastos de embrião de pinto: eficiência relativa

Vírus ^a	VSV — PFU/garrafa ^b (% do controle)			
	1,0	0,1	0,01	0,001
Apeu	0	1	15,5	62
Caraparu	SD ^d	SD	81	92
Itaqui	SD	SD	59,5	76
Marituba	4	54,5	83,5	94
Murucutu	0	1	30,5	47
Nepuyo	0	9	52	61
Oriboca	0	4	16,5	43

a — Células infectadas por 48 horas

b — Média de duas garrafas

c — Multiplicidade de infecção adicionada de arbovírus do grupo C

d — Sem dado

Quando se infetaram células amnióticas humanas com os vírus Apeu ($m = 0,05$), Caraparu ($m = 0,015$), Itaqui, Murutucu, Nepuyo e Oriboca ($m = 0,1$), também foi verificada a interferência sobre a multiplicação do VSV.

A inoculação do vírus Marituba em fibroblastos de embrião de pinto, com multiplicidade de infecção adicionadas até 10, não causou efeito citopático, nas condições experimentais utilizadas. Em concentrações maiores, ocasionalmente se pode notar efeito citopático ligeiro

(duas cruzes), em 48 horas de infecção. Nas outras células, empregadas em experiências de interferência, tais como células amnióticas humanas primárias e células L-A9, também não ocorreu efeito citopático do vírus, nas condições usadas neste trabalho. O vírus Marituba não produziu placas em fibroblastos de embrião de pinto, em multiplicidades de 100 a 10^{-6} , nas condições relatadas para a medida das PFU. Quando se infetaram as células com altas multiplicidades (100 e 10 TCD₅₀/célula), por 48 horas, e depois cobriu-se a monocamada com meio semi-sólido (como na medida das PFU), o efeito citopático, por vezes aparecia, impedindo a contagem das PFU do vírus-desafio. Os outros arbovírus do grupo C, utilizados na demonstração da interferência, não provocaram efeito visível nos testes, com os métodos empregados.

Discussão

Como se depreende das tabelas 1 e 2, o vírus Marituba, ao infetar fibroblastos de embrião de pinto por 48 horas, interferiu no aparecimento de placas dos vírus vaccínia, VSV e Sindbis. Trata-se de uma interferência que é ativa contra diversos vírus pertencentes à família *Poxviridae*, gênero *Orthopoxvirus* (vírus vaccínia) que contém DNA, à família *Rhabdoviridae*, gênero *Vesiculovirus* (VSV) e à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus* (vírus Sindbis), que contém, como ácido nucléico, o RNA (7). Quando se compara a sensibilidade dos vírus utilizados paralelamente (tabela 2), verifica-se que há um gradiente, sendo o vírus Sindbis mais sensível, o VSV ocupando uma posição intermediária e o NDV sendo resistente à interferência induzida pelo vírus Marituba.

Os dados seguintes (tabela 3) indicam que o efeito citopático do VSV nas células amnióticas humanas foi inibido com a infecção prévia das células com o vírus Marituba. O mesmo ocorreu nas células L-A9 de camundongo. A interferência não se limita a um tipo de hospedeiro, sendo demonstrável em cultivos celulares originados de diversas espécies.

Os arbovírus do grupo C, utilizados neste trabalho, foram capazes de induzir a interferência (tabela 4 e comentário em resultados) tanto nos fibroblastos de embrião de pinto, como nas células amnióticas humanas, revelando que esta é uma propriedade geral destes arbovírus e talvez também o seja para aqueles componentes do grupo não estudados (os vírus Madrid, Ossa,

Restan e Gumbo Limbo). Quando se compara a capacidade indutora dos diversos vírus testados, vê-se que alguns vírus são mais eficientes, como os vírus Apeu, Murutucu, Nepuyo e Ori-boca; os vírus Caraparu e Marituba são fracamente interferentes. Pelos dados da tabela 4 também ficou corroborada a noção de que a interferência depende da dose de vírus empregada, mas há um limiar acima do qual a resposta celular não pode aumentar.

De que tipo de interferência se trata? Para esclarecer este ponto fundamental, teríamos de averiguar qual o seu mecanismo. A interferência que descobrimos tinha as seguintes características básicas:

1. Era induzida por vários componentes do grupo C dos arbovírus.
2. Era possível demonstrá-la em cultivos celulares de diversas espécies animais.
3. Impedia o crescimento de vários vírus não relacionados.

A interferência entre os vírus animais pode ser classificada, do ponto de vista operacional (8) em:

1. Interferência por interferon
2. Interferência não associada ao interferon
 - 2.1 Interferência dos receptores celulares
 - 2.2 Interferência na penetração do vírus
 - 2.3 Interferência intracelular
 - 2.3.1 Interferência por partículas defectivas
 - 2.3.2 Interferência intrínseca
 - 2.3.3 Interferência por componente estrutural do vírion
 - 2.3.4 Outras interferências

De acordo com as propriedades das interferências (8), verificamos que não se tratava de interferência ao nível dos receptores celulares, pois esta se dá entre vírus estreitamente relacionados ou homólogos (1, 2). Tampouco poderia a interferência ser na fase de penetração, porque esta também depende de vírus homólogos ou muito próximos do ponto de vista de classificação (3, 5, 14). O mesmo ocorreria com a interferência por partícula defectiva, que só acontece com uma mutante do vírus "standard" (11).

Restam, portanto, a interferência mediada por interferon e as atuantes ao nível intracelular (8). Estudos relativamente às condições de interferência (cinética, modificações dos indutores) e a presença de interferon estão sendo realizados.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu auxílio do CNPq (TC 15926), Convênio Funtec 132, CAPES e Conselho de Pesquisas da UFMG. Os autores agradecem ao prof. Maurício Rezende a tentativa de

isolamento de micoplasma e a João Rodrigues dos Santos, Maria Lúcia Trindade e Bernadete de Jesus Martins o apoio técnico, como também aos profs. José Noronha Peres e Zigman Brener a revisão do trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Baluda, M.A. — Homologous interference by ultraviolet-inactivated Newcastle disease virus. *Virology*, 4:72-96, 1957.
2. Baluda, M.A. — Loss of viral receptors in homologous interference by ultraviolet-irradiated Newcastle disease virus. *Virology* 7:315-327, 1959.
3. Bratt, M.A. & Rubin, H. — Specific interference among strains of Newcastle disease virus. *Virology*, 35: 395-407, 1968.
4. Causey, O.R.; Causey, C.E.; Maroja, O.M. & Macedo, D.G. — The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto undescribed serological groups, in the amazon region of Brazil. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 10:227-249, 1961.
5. Crowell, R.L. & Syverton, J.T. — The mammalian cell-virus relationship. VI — Sustained infection of HeLa cells by Coxsackie B 3 virus and effect on super infection. *J. Exp. Med.*, 113:419-435, 1961.
6. Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H. S.; & Wood Jr., W.B. — *Microbiology*. New York, Harper & Row, 1967.
7. Fenner, F. — The classification and nomenclature of viruses. *J. Gen. Virol.*, 31:463-470, 1976.
8. Golgher, R.R. — Interferência por arbovírus do grupo C. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1975 (Tese).
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. Ho, M. — Animal viruses and interferon formation. In: *Interferons and interferon inducers*, p. 29-44. Amsterdam, North Holland Publishing Co., 1973.
11. Huang, A.S. — Defective interfering viruses. *Annu. Rev. Microbiol.*, 27:101-117, 1973.
12. Peixoto, M.L.P. — Sensibilidade de arbovírus do grupo C (*Bunyaviridae*) à ação de interferon humano. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1977 (Tese).
13. Reed, L.J. & Muench, H. — A simple method of estimating fifty percent end-points. *Amer. J. Hyg.*, 27:493-497, 1938.
14. Sarma, P.S. & Log, T. — Subgroup classification of feline leukemia and sarcoma viruses by viral interference and neutralization tests. *Virology*, 54:160-169, 1973.
15. Scherer, W.F. — The utilization of pure strain mammalian cells (Earle) for the cultivation of viruses "in vitro". I — Multiplication of pseudorabies and herpes simplex viruses. *Amer. J. Pathol.*, 29:113-137, 1953.
16. Schmidt, N.J. — Tissue culture methods and procedures for diagnostic virology. In: *Diagnostic procedures for viral and rickettsial diseases*, p. 78-116. 3rd ed. New York, American Public Health Association, Inc., 1964.
17. Yasumura, Y. & Kawakita, Y. — Research into SV — 40 by tissue culture. *Nippon Rinsho*, 21:1201, 1963. Apud: Bergold, D. W. & Mazzali, R. — Plaque formation by arboviruses. *J. Gen. Virol.*, 2:273-284, 1968.

Caracterização bioquímica de *Yersinia enterocolotica* e de *Yersinia pseudotuberculosis**

D. P. Falcão **
 W. H. Ewing ***
 B. R. Davis ***
 & G. J. Hermann ***

Resumo

Estudo da caracterização bioquímica dessas duas espécies, empregando-se 43 amostras de *Y. enterocolitica* e 49 de *Y. pseudotuberculosis*, todas de coleção e de origem diversa, frente a 64 substratos, sendo parte das provas realizadas a diferentes temperaturas de incubação (22°C e 35-37°C). Verificou-se a importância da padronização de técnicas, de tempo de leitura e de temperatura de incubação para equivalência dos resultados. Foi organizada tabela contendo nove provas capazes de diferenciar, bioquimicamente, as duas espécies entre si e de outras enterobactérias.

Summary

A biochemical characterization of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis

A study of the biochemical characterization of these two species was made using 43 strains of *Y. enterocolitica* and 49 of *Y. pseudotuberculosis*. All of them are from collection and different origin. Tested were made on 64 substrates, part of them under different temperatures (22°C and 35-37°C). The importance of a standardization of techniques, the time for reading and the incubation temperature, for best equilibrium of results, were verified. A table was prepared to the results of nine tests for the biochemical distinction between the two species and other enterobacteria.

Introdução

A caracterização de *Y. pseudotuberculosis* não tem ocasionado inúmeras controvérsias. O mesmo tem ocorrido em relação a *Y. enterocolitica*. Revendo-se os principais trabalhos sobre metabolismo da *Y. pseudotuberculosis*, observa-se maior uniformidade nos resultados apresentados pelos diversos autores (5, 13, 14, 17, 28, 30).

Mollaret (13) observou que, variando-se a temperatura de incubação, *Y. pseudotuberculosis* apresenta diferença de comportamento, com relação a algumas provas.

De acordo com o Manual de Bergey (1), os espécimes de *Y. pseudotuberculosis* são móveis a 22°C e imóveis a 37°C; positivos para as provas de uréia, esculina, arbutina, amido, beta galactosidase; fermentam ramnose, salicina, adoni-

tol, arabinose, dextrina, galactose, melibiose; são negativos para as provas de ornitina descarboxilase, utilização do citrato, indol, H₂S, KCN e d-tartarato; e não fermentam sacarose, amidalina, arabinol, cellobiose, inulina, lactose, sorbitol, sorbose e xilose.

Em relação às características bioquímicas de *Y. enterocolitica*, os resultados apresentados por diversos autores são muito variáveis, sendo que alguns deles sugerem a exclusão de amostras, com características bioquímicas aberrantes, da espécie *Y. enterocolitica*, ainda que continuem pertencendo ao gênero *Yersinia* (2, 11, 29, 31).

Mollaret & Chevalier (15), em 1964, realizaram estudo bioquímico de 82 amostras bacterianas as quais, segundo os autores, constituiam grupo homogêneo e eram relacionadas com o Bacilo de Malassez e Vignal, pela pato-

* Trabalho realizado no "Center for Disease Control", Atlanta, Georgia, E.U.A., com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (74/803).

** Universidade Estadual Paulista, UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP, Brasil

*** Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, E.U.A.

genicidade em condições naturais, pelas suas principais características culturais e bioquímicas. Por outro lado, diferiam de *Y. pseudotuberculosis* pelo comportamento frente à ramnose, sacarose, cellobiose, melibiose, esculina e ornitina. Em trabalho posterior, Mollaret & Lucas (17) descreveram o comportamento de amostras de *Y. enterocolitica*, isoladas de lebres, com reações bioquímicas diferentes das anteriores.

Frederiksen (9), em seu clássico estudo sobre *Y. enterocolitica*, caracterizou-as através de uma série de provas bioquímicas.

Darland & col. (4) mostraram a influência da temperatura de incubação no comportamento bioquímico de *Y. enterocolitica* e de *Y. pseudotuberculosis*.

Niléhn (21, 23, 24), na Suécia e Wauters (34), na Bélgica, estudaram, exaustivamente, a bioquímica de *Y. enterocolitica* e dividiram-nas em cinco biotipos, de acordo com as características metabólicas. Amostras, com características mais aberrantes, isto é, com nitrato, ornitina, beta galactosidase negativas, pertencem ao biotipo cinco, da classificação dos dois autores.

Knapp & Thal (11), usando as amostras de *Y. enterocolitica*, propostas como amostras-padrão, realizaram uma série de provas bioquímicas e propuseram algumas como características da espécie.

Bottone & col. (2) descrevem o isolamento de amostras de *Y. enterocolitica* que fermentam ramnose e rafinose, características essas divergentes das apresentadas, anteriormente, pelas amostras dessa espécie bacteriana; estudos mais detalhados sobre esse grupo de bactérias ramnose positivas foram realizados por Chester & Stotzky (3).

Mollaret & Thal (19), quando escreveram o capítulo sobre *Yersinia*, na oitava edição do Manual de Bergey, caracterizaram a espécie *Y. enterocolitica* com as seguintes reações bioquímicas: móveis a 22°C e imóveis a 37°C; positivas para as provas de uréia, ornitina descarboxilase, beta galactosidase, arbutina; fermentam sacarose, cellobiose, galactose, sorbitol e sorbose; diferentes reações para indol, arabinose, dextrina, amido, xilose e KCN; negativas para esculina, citrato, H₂S, d-tartarato; não produzem gás de glicose e não fermentam ramnose, salicina, adonitol, amidalina, arabinitol, inulina, lactose, melibiose.

Observa-se, portanto, grande divergência entre diversos autores, no que diz respeito, especialmente a *Y. enterocolitica*. Muitas amos-

tras têm sido classificadas como tal, sem que estudos mais detalhados sobre algumas de suas características tivessem sido realizados. Considerações a esse respeito têm trazido inúmeras controvérsias e o Subcomitê de Taxonomia para *Yersinia*, *Pasteurella* e *Francisella* recomendou que fossem intensificados os estudos de *Y. enterocolitica*, principalmente no que diz respeito aos aspectos bioquímicos, sorológicos e genéticos (16).

Visando contribuir para esse propósito, realizamos o estudo das características bioquímicas das duas espécies, frente a um número considerável de substratos, usando-se diferentes temperaturas de incubação, em alguns testes, na tentativa de ampliar as possibilidades de identificação mais correta, principalmente de *Y. enterocolitica*, e de apresentar esquema simplificado e prático que pudesse ser incluído, rotineiramente, na pesquisa das duas espécies bacterianas.

Material e Métodos

Amostras — 43 de *Y. enterocolitica* e 49 de *Y. pseudotuberculosis*, de origem diversa, todas de coleção.

Testes — Foram realizadas as provas relacionadas a seguir, empregando-se meios e técnicas recomendadas por Edwards & Ewing (6) e Ewing & Davis (8): redução de nitrato a nitrito; indofenol oxidase; oxidação/fermentação; vermelho de metila-VM e Voges-Proskauer-VP; lipase; pectinase; crescimento em presença de KCN; crescimento em presença de "Cetrimide"; teste de motilidade; produção de H₂S, usando-se "Peptone Iron Agar"-PIA e "Triple Sugar Iron"-TSI; indol; urease; lisina descarboxilase; arginina diidrolase; ornitina descarboxilase; fenilalanina desaminase; liquefação da gelatina; hidrólise da esculina e arbutina; crescimento em meios sintéticos, contendo uma única fonte de carbono e energia: citrato de Simons, acetato de sódio e alginato de sódio; utilização de ácidos orgânicos, em meios contendo fonte orgânica de nitrogênio: citrato de Christensen, caldo malonato, caldo mucato e alginato nutriente; utilização de ácidos orgânicos segundo Kauffmann e Petersen: citrato, d-tartarato, L-tartarato e D-tartarato; fermentação de carboidratos e compostos correlatos: glicose, lactose, inositol, maltose, sacarose, manitol, dulcitol, salicina, adonitol, sorbitol, arabinose, rafinose, ramnose, xilose, trealose, ce-

lobiose, glicerol, alfa metil glicosideo, eritritol, manose, amidalina, inulina, levulose, ribose, galactose, sorbose, d-arabinose, metil xilosídeo, metil d-manosídeo e melitizote.

Foram também realizados os testes da desoxirribonuclease- DN-ase, utilizando o meio de "Toluidine Blue DN-ase" (27) e da beta galactosidase, utilizando meio e técnica recomendados por Negut & Hermann (20), sendo que as reações negativas foram repetidas, usando-se discos de ONPG (Difco), de acordo com a técnica indicada pelos fabricantes dos discos.

Atmosfera e temperatura de incubação — A incubação foi em aerobiose, a 35-37°C, sendo as provas, relacionadas a seguir, em duplicata, incubadas também a 22°C: indol, VM, VP, citrato de Simons, motilidade, acetato de sódio, beta galactosidase, DN-ase, lipase, ácidos orgânicos (segundo Kauffmann e Petersen), glicose, lactose, inositol e maltose. O teste da gelatina foi incubado a 22°C.

Leitura das provas bioquímicas — Reações de fermentação, liquefação e hidrólise — leituras

realizadas até 21 dias; TSI, PIA, urease, citrato de Simons, citrato de Christensen, alginato de sódio, alginato nutriente, acetato de sódio, lipase, desoxirribonuclease, "Cetrimide", pectato, motilidade — leituras realizadas até 7 dias; lisina, arginina e ornitina — leituras realizadas até 4 dias; indol, VM, VP, KCN, mucato, malonato, O/F — leituras realizadas no 2º dia; beta galactosidase, nitrato, fenilalanina, oxidase — leituras realizadas em 24 horas; ácidos orgânicos, segundo Kauffmann e Petersen — leituras realizadas no 2º, 5º e 14º dias.

Resultados e Discussão

As características das amostras de *Y. enterocolitica* são apresentadas nas tabelas 1-4. A Tabela 1 contém os resultados das provas que convencionamos chamar de provas gerais. A Tabela 2 contém os resultados das provas de utilização de ácidos orgânicos. A Tabela 3, os resultados das provas de fermentação de carboidratos em que verificamos somente acidificação do meio e a Tabela 4 os resultados da

Tabela 1 — Características bioquímicas (provas gerais) das 43 amostras de *Y. enterocolitica*

Teste ou Substrato	Número de amostras				Negativas	
	Positivas					
	1-2 dias	3-7 dias	14 dias	21 dias		
Redução de NO ₃ a NO ₂	41				2 43	
Oxidase						
Oxidação/Fermentação	F-42	F-1				
Prova do VM a 22°C	40				3	
a 35-37°C	43					
Prova do VP a 22°C	26				17 43	
a 35-37°C						
Beta Galactosidase 22°C	41				2	
a 35-37°C	38				5	
DN-ase a 22°C	1	20			22	
a 35-37°C	1	21			21	
Lipase a 22°C	28	4			11	
a 35-37°C	28	13			2	
Pectato					43	
KCN					43	
"Cetrimide"		29			14	
Motilidade a 22°C	42	1				
a 35-37°C					43	
Produção de H ₂ S de TSI					43	
de PIA					43	
Produção de Indol 22°C	26				17	
35-37°C	28				15	
Prova da Urease	33	7			3	
Lisina Descarboxilase					43	
Arginina Diidrolase					43	
Ornitina Descarboxilase	40	1			2	
Fenilalanina Desaminase					43	
Hidrólise Gelatina 22°C	15	9	1		42	
Hidrólise da Esculina			13	3	3	
Hidrólise da Arbutina				24	19	

Tabela 2 — Utilização de ácidos orgânicos pelas 43 amostras de *Y. enterocolitica*

Teste ou substrato	Número de amostras				Negativas	
	Positivas					
	1-2 dias	3-7 dias	14 dias	21 dias		
Citrato Simons 22°C 35-37°C	2	2			41	
Acetato sódio 22°C 35-37°C	7	31			41	
Alginato sódio		2			5	
Citrato Christensen	7	10			41	
Malonato sódio					43	
Mucato					26	
Alginato nutritivo					43	
*Citrato 22°C 35-37°C		26	3		43	
*d-Tartarato 22°C 35-37°C			15		14	
*i-Tartarato 22°C 35-37°C					28	
*l-Tartarato 22°C 35-37°C					43	
					43	
					43	
					43	
					43	
					43	
					43	

* segundo Kauffmann & Petersen

Tabela 3 — Fermentação de carboidratos e compostos correlatos com formação de ácidos pelas 43 amostras de *Y. enterocolitica*

Teste ou substrato	Número de amostras				Negativas	
	Positivas					
	1-2 dias	3-7 dias	14 dias	21 dias		
Glicose a 22°C a 35-37°C	43 43					
Lactose a 22°C a 35-37°C	1 1	3 32	14 5	16 2	12 32	
Inositol a 22°C a 35-37°C		26	1	2	8	
Maltose a 22°C a 35-37°C	39 30	3 10	1 2		16	
Sacarose	37				1	
Manitol	43				6	
Dulcitol					43	
Salicina	18	6	6	3	10	
Adonitol					43	
Sorbitol	42				1	
Arabinose	40	2		1		
Rafinose	1	2			40	
Ramnose	2				41	
Xilose	28	9	1	1	4	
Trealose	42				1	
Cellobiose	43					
Glicerol	23	19	1			
Alfa metil glicosídeo						
Eritritol	2				41	
Manose	43				43	
Amidalina	37	5	1			
Inulina				1	42	
Levulose	43					
Ribose	41	1	1			
Galactose	9	34				
Sorbose	40	2			1	
D-Arabinose					43	
Metil xilosídeo					43	
Metil D-manosídeo					43	
Melizitose					43	

Tabela 4 — Fermentação de carboidratos e compostos correlatos com formação de gases pelas 43 amostras de *Y. enterocolitica*

Teste ou substrato	Número de Amostras				% Gases tubo de Durhan	
	Positivas					
	1-2 dias	3-7 dias	14 dias	21 dias		
Glicose a 22°C		16		1	26	5
a 35-37°C		1		1	41	5
Lactose a 22°C			3	6	34	5
a 35-37°C		1	4	1	37	5
Inositol a 22°C		29			14	5
a 35-37°C		27			16	5
Maltose a 22°C	24	6	6		7	5 a 15
a 35-37°C	14	8	3	1	17	5 a 10
Sacarose	13	4			26	5
Manitol	15				28	5 a 10
Dulcitol					43	
Salicina	11	2		2	25	5 a 10
Adonitol					43	
Sorbitol	27	3			13	5 a 10
Arabinose	23	10			10	5 a 10
Rafinose		1		1	41	5 a 10
Ramnose					43	
Xilose	14	15			14	5 a 30
Treloose	23	5			15	5 a 20
Cellobiose	11	10			22	5 a 10
Glicerol	8	13		2	20	5 a 40
Alfa metil glicosídeo		2			41	10
Eritritol					43	
Manose	5				38	5
Amidalina	8	4			31	5 a 10
Inulina					43	
Levulose		1			42	5
Ribose	11	11			21	5
Galactose	1	17			25	5
Sorbose		5			38	5
D-arabinose					43	
Metil xilosídeo					43	
Metil D-manosídeo					43	
Melitizose					43	

mesma prova, com verificação da produção de gases.

As características bioquímicas das amostras de *Y. pseudotuberculosis* são apresentadas nas Tabelas 5-7, em que a divisão das provas foi feita como para as amostras de *Y. enterocolitica*. Não há tabela com os resultados sobre a formação de gases, já que todas as amostras de *Y. pseudotuberculosis* foram agasogênicas.

As Tabelas 8-10 contêm o resumo das características bioquímicas de *Y. enterocolitica* (Tabelas 8 e 9) e de *Y. pseudotuberculosis* (Tabela 10). Na Tabela 11, aparecem as características das amostras das duas espécies em "Triple Sugar Iron"-TSI; na Tabela 12, estão os testes diferenciais entre *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, bem os que permitem diferenciar as duas espécies das demais enterobactérias.

Os resultados dos testes são expressos por sinais ou letras, cujos significados são os seguintes:

- + = 90% ou mais das reações positivas dentro de 1 a 2 dias
- = 90% ou mais das reações negativas
- (+) = 90% ou mais das reações positivas a partir do 3º dia (tardivamente positivas)
- + ou - = maioria das reações positivas, dentro de 1-2 dias, e outras negativas
- ou + = maioria das reações negativas e outras positivas, dentro de 1-2 dias
- d = diferentes reações, como: +, (+), -. Mesmo não tendo alcançado 100% de positividade, não foram classificados com a letra "d", os testes nos quais houve 90% ou mais de positividade, quer isso tenha ocorrido dentro de 1-2 dias, quer a partir do 3º dia
- F = utilização da glicose por fermentação no meio de Hugh e Leifson

Tabela 5 — Características bioquímicas (provas gerais) das 49 amostras de *Y. pseudotuberculosis*

Teste ou Substrato	Número de amostras				Negativas	
	Positivas					
	1-2 dias	3-7 dias	14 dias	21 dias		
Redução de NO ₃ a NO ₂	48				1	
Oxidase					49	
Oxidação/Fermentação	F-49					
Prova do VM a 22°C	47				2	
a 35-37°C	49					
Prova do VP a 22°C					49	
a 35-37°C					49	
Beta Galactosidase 22°C	49					
a 35-37°C	49					
DN-ase a 22°C		1			48	
a 35-37°C		39			10	
Lipase a 22°C		5			44	
a 35-37°C	5	40			4	
Pectato					49	
KCN					49	
"Cetrimide"		1			48	
Motilidade a 22°C	27	22				
a 35-37°C					49	
Produção de H ₂ S de TSI					49	
de PIA					49	
Produção de Indol 22°C					49	
35-37°C	49				49	
Prova da Urease						
Lisina Descarboxilase					49	
Arginina Diidrolase					49	
Ornitina Descarboxilase					49	
Fenilalanina Desaminase					49	
Hidrólise Gelatina 22°C					49	
Hidrólise da Esculina	49					
Hidrólise da Arbutina				49		

Tabela 6 — Utilização de ácidos orgânicos pelas 49 amostras de *Y. pseudotuberculosis*

Teste ou substrato	Número de amostras				Negativas	
	Positivas					
	1-2 dias	3-7 dias	14 dias	21 dias		
Citrato Simons 22°C		34			15	
35-37°C					49	
Acetato sódio 22°C		46			3	
35-37°C	1	17			31	
Alginato sódio					49	
Citrato Christensen		4			45	
Malonato sódio					49	
Mucato					49	
Alginato nutriente					49	
*Citrato 22°C					49	
35-37°C					49	
*d-Tartarato 22°C					49	
35-37°C					49	
*i-Tartarato 22°C					49	
35-37°C					49	
*I-Tartarato 22°C					49	
35-37°C					49	

* segundo Kauffmann & Petersen

Tabela 7 — Fermentação de carboidratos e compostos correlatos com formação de ácidos pelas 49 amostras de *Y. pseudotuberculosis*

Teste ou substrato	Número de amostras			
	Positivas			Negativas
	1-2 dias	3-7 dias	14 dias	
Glicose a 22°C	49			
a 35-37°C	49			
Lactose a 22°C				49
a 35-37°C				49
Inositol a 22°C				49
a 35-37°C				49
Maltose a 22°C	49			5
a 35-37°C	44			
Sacarose		1		48
Manitol	48	1		
Dulcitol				49
Salicina		48		
Adonitol			1	48
Sorbitol				49
Arabinose	21	28		
Rafinose	10			39
Ramnose	49			
Xilose	48	1		
Trealose	48	1		
Cellobiose				49
Glicerol		49		
Alfa metil glicosídeo				49
Eritritol				49
Manose	49			
Amidalina				49
Inulina				49
Levulose	49			
Ribose	5	35		9
Galactose	9	38		2
Sorbose				49
D-Arabinose				49
Metil xilosídeo				49
Metil D-manosídeo				49
Melizitose				49

Tabela 8 — Sumário das características bioquímicas das 43 amostras de *Y. enterocolitica*

Sinal	Teste ou substrato
+	Nitrato; F; Ornitina; Manitol; Sorbitol; Arabinose; Trealose; Cellobiose; Manose; Levulose; Ribose e Sorbose. Motilidade e Beta Galactosidase a 22°C. VM e Glicose a 22°C e 35-37°C.
+ ou (+)	Urease; Xilose; Glicerol e Amidalina. Lipase a 35-37°C. Maltose a 22°C e 35-37°C.
(+) ou +	Esculinina e Galactose.
+ ou -	Sacarose. VP a 22°C. Beta Galactosidase a 35-37°C. Indol a 22°C e 35-37°C.
(+) ou -	Arbutina. Citrato segundo Kauffmann e Petersen a 22°C. Inositol a 22°C e 35-37°C.
- ou (+)	Citrato segundo Kauffmann e Petersen a 35-37°C.
d	"Cetrimide"; Citrato de Christensen e Salicina. DN-ase e Lactose a 22°C e 35-37°C. Lipase e Acetato de Sódio a 22°C.
	Oxidase; Pectato; KCN; H ₂ S; Lisina; Arginina; Fenilalanina; Gelatina; Alginato de Sódio; Alginato Nutriente; Malonato; Mucato; Dulcitol; Adonitol; Rafinose; Ramnose; Alfa Metil Glicosídeo; Eritritol; Inulina; D-Arabinose; Metil Xilosídeo; Metil D-Manosídeo e Melizitose. VP; Motilidade e Acetato de Sódio a 35-37°C. Citrato Simons; d-Tartarato; i-Tartarato e l-Tartarato a 22°C e 35-37°C

Tabela 9 — Sumário dos resultados de fermentação com produção de gases pelas 43 amostras de *Y. enterocolitica*

Sinal	Teste ou substrato
(+) ou -	Inositol a 22°C e 35-37°C.
- ou +	Manitol e Manose
- ou (+)	Sorbose. Glicose a 22°C. Lactose a 22°C e 35-37°C.
d	Sacarose; Salicina; Sorbitol; Arabinose; Xilose; Trealose; Cellobiose; Glicerol; Amidalina; Ribose e Galactose. Maltose a 22°C e 35-37°C.
-	Dulcitol; Adonitol; Rafinose; Ramnose; Alfa Metil Glicosídeo; Eritritol; Inulina; Levulose; D-Arabinose; Metil Xilosídeo; Metil D-Manosídeo e Melizitose. Glicose a 35-37°C.

Tabela 10 — Sumário das características bioquímicas das 49 amostras de *Y. pseudotuberculosis*

Sinal	Teste ou substrato
+	Nitrato; F; Urease; Esculina; Manitol; Ramnose; Xilose; Trealose; Manose e Levulose. VM; Beta Galactosidase e Glicose a 22°C e 35-37°C. Maltose a 22°C.
(+) ou +	Arabinose e Galactose. Lipase a 35-37°C.
+ ou (+)	Motilidade a 22°C.
(+)	Arbutina; Glicerol e Salicina. Acetato de Sódio a 22°C.
+ ou -	Maltose a 35°C.
(+) ou -	DN-ase a 35-37°C. Citrato de Simons a 22°C;
- ou +	Rafinose.
- ou (+)	Lipase a 22°C. Acetato de Sódio a 35-37°C.
d	Ribose.
	Oxidase; Pectato; KCN; "Cetrimide"; H ₂ S; Lisina; Arginina; Ornitina; Fenilalanina; Gelatina; Alginato de Sódio; Citrato de Christensen; Malonato de Sódio; Mucato; Alginato Nutriente; Sacarose; Dulcitol; Adonitol; Sorbitol; Cellobiose; Alfa Metil Glicosídeo; Eritritol; Amidalina; Inulina; Sorbose; D-Arabinose; Metil Xilosídeo; Metil D-Manosídeo e Melizitose. VP; Indol e Ácidos Orgânicos segundo Kauffmann. Lactose e Inositol a 22°C e a 35-37°C. DN-ase a 22°C. Motilidade e Citrato de Simons a 35-37°C.

Tabela 11 — Características das 43 amostras de *Y. enterocolitica* e das 49 de *Y. pseudotuberculosis* em "Triple Sugar Iron" — TSI

Espécie	Base	%	Superfície	%	Gás %	H ₂ S %
<i>Y. enterocolitica</i>	Ácida	100	Ácida Alcalina	86,0 14,0	16,6	—
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Ácida	100	Ácida Alcalina	61,2 38,8	—	—

Tabela 12 — Provas de maior valor na caracterização e diferenciação de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*

Teste ou substrato	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
Uréia	± ou (+)	-
Fenilalanina	-	-
KCN	-	-
Motilidade a 22°C a 35-37°C	+	± ou (+)
Ornitiona	+	-
Sorbitol	+	-
Celobiose	+	-
Sorbose	+	-
Amidalina	± ou (+)	-

A análise dos dados obtidos, comparativamente aos de outros autores, revela grande divergência de resultados, no que diz respeito a *Y. enterocolitica*. Em relação a *Y. pseudotuberculosis*, as divergências são bem menores.

Darland & col. (4) testaram amostras de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* frente a diferentes substratos, a maior parte dos quais empregados neste trabalho. Apesar da diversidade do número e origem das amostras usadas nos dois trabalhos, os resultados foram menos divergentes que os verificados em relação a outros autores.

Muitas vezes, a comparação de resultados foi difícil, porque as técnicas utilizadas, temperatura de incubação e tempo de leitura não são uniformes.

Quanto a *Y. pseudotuberculosis*, na prova de desoxirribonuclease, resultados percentuais positivos, a 35-37°C, foram superiores àqueles de Darland & col. (4). Reações positivas foram evidenciadas no sétimo dia de incubação, enquanto que, no trabalho acima referido, não há referência a tempo de leitura. Assinalamos considerável diferença de resultados positivos quando da variação da temperatura de incubação de 22°C para 35-37°C. Essa variação de temperatura, em relação à positividade, foi ainda verificada nas provas de utilização do citrato de Simons, acetato de sódio e lipase.

Os resultados relativos ao crescimento, em citrato de Christensen, foram, percentualmente, inferiores aos assinalados por Darland & col. (4). Mas, quer em nossa experiência, quer naquela dos referidos autores, os resultados positivos apareceram a partir do terceiro dia de incubação.

Comparativamente aos de outros autores, os testes do pectato, lipase e H₂S apresentaram resultados algumas vezes semelhantes e outras vezes divergentes (4, 6, 19, 33).

Analizando a fermentação de carboidratos e compostos correlatos pelas amostras de *Y. pseudotuberculosis*, verifica-se que Schütze (28), na prova do adonitol, obteve resultados positivos, enquanto nossas amostras apresentaram resultados negativos, dados esses coincidentes com os de outros autores (4, 5). Mollaret & Lucas (17), estudando amostras de *Y. pseudotuberculosis*, afirmam que 50% delas fermentam esse carboidrato e Thal (30) apresenta resultado variável. No Manual de Bergey (1), essa prova aparece como positiva, discordando dos dados apresentados em trabalhos anteriores dos autores do capítulo de *Yersinia* no referido Manual.

Quanto à arabinose, obtivemos 100% de positividade, concordando com os dados apresentados por outros autores (4, 19, 30). No entanto, Devignat (5) apresenta para essa prova resultados variáveis.

Os resultados apresentados em relação à metabolização da xilose, foram positivos, dados coincidentes aos de outros autores (4, 5, 11, 17, 28, 30). Entretanto, na oitava edição do Manual de Bergey (1), essa reação aparece como negativa. Acreditamos que esse dado tenha sido impresso errado no referido Manual, pois os autores que escreveram o capítulo referente à *Yersinia*, em outros trabalhos, dão essa reação como positiva (11, 17, 30).

O resultado negativo, frente à inulina, é semelhante ao observado por outros autores (19, 28), mas contrário ao resultado positivo relatado por Devignat (5). Este autor afirma que resultados positivos para essa prova foram evidenciados, quando da utilização do indicador de Vermelho de Fenol. Com o Indicador de Andrade, obteve apenas resultados negativos.

Em relação à utilização da rafinose, nossos resultados divergem apenas daqueles apresentados por Schütze (28).

Analizando resultados das provas bioquímicas, de amostras de *Y. enterocolitica*, comparando-as aos de outros autores, frente a alguns substratos, observou-se em alguns deles, dados totalmente opostos, e, outras vezes, dados bastante divergentes.

Knapp & Thal (10), ao contestarem a presença de certas amostras bacterianas, dentro da espécie *Y. enterocolitica*, fazem referência, especialmente, àquelas isoladas de lebres por não possuirem as enzimas beta galactosidase, ornitina descarbossilase e nitrato redutase, por não acidificarem a amidalina, a dextrina e a trealose. Frederiksen (9) afirma que para *Y. en-*

terocolítica a redução de nitrato a nitrito, é sempre positiva, com raras exceções. Niléhn (24) apresenta para esse substrato resultados positivos ou diferentes tipos de reações.

Quanto ao teste da beta galactosidase, nossos resultados, a 35-37°C, são bastante semelhantes aos de Mollaret & col. (15), Frederiksen (9) e Wauters (34), isto é, positivos, com raras exceções negativos. No entanto, são um pouco diferentes dos de Darland & col. (4). Enquanto evidenciamos 88,3% de reações positivas, eles observaram apenas 24,0% de positividade. A 22°C, nossos resultados foram praticamente iguais aos daqueles autores.

Na reação de Voges-Proskauer, 100% das amostras foram negativas a 35-37°C, mas 60,4% positivas a 22°C. Frederiksen (9) afirma ser essa prova positiva a 20-30°C e negativa a 37°C. Para Niléhn (25), este teste, a 25°C, pode ser positivo ou pode ser variável. Wauters (34) ressalta que a produção de acetoína, a partir de glicose, é uma das provas mais fortemente influenciadas pela temperatura. Afirma que essa reação apresenta resultados positivos com maior freqüência a 22°C que a 37°C.

Na prova da desoxirribonuclease a 35-37°C, os dados de Darland & col. (4) foram diferentes dos nossos; apenas 2,7% de suas amostras foram positivas, quando obtivemos 51,1% de positividade. Observe-se que os resultados positivos, apresentados por aqueles autores, apareceram dentro dos dois primeiros dias de incubação e a quase totalidade dos nossos foi observada a partir do terceiro dia de incubação.

Os resultados da prova da pectinase mostraram-se semelhantes ou divergentes de outros autores (4, 33).

Para a prova da lipase, os resultados foram diferentes daqueles apresentados por Darland & col. (4) a 22°C, mas não a 35-37°C. Na prova de "Cetrimide", aqueles autores obtiveram 4,0% de reações positivas, enquanto nossa porcentagem de positividade foi de 67,4%; praticamente todas as reações positivas apareceram a partir do terceiro dia de incubação, enquanto que as deles, dentro dos dois primeiros dias.

No que diz respeito à pesquisa da urease, entre as amostras de *Y. enterocolitica*, verificamos que algumas amostras não possuíam essa enzima, coincidindo com outros autores (4). Van Noyen & col. (32) descrevem o isolamento de uma bactéria com todas as características de *Y. enterocolitica*, mas incapaz de hidrolisar uréia, afirmando que, devido a isso, a urease

não pode ser considerada como elemento fundamental na identificação dessa bactéria. Discordamos dessa afirmativa, pois se sabe que as porcentagens de positividade, em relação às provas bioquímicas, são estatísticas e não absolutas já que num determinado momento a bactéria, por uma alteração genética, pode perder algumas características. Considere-se ainda essa prova como fundamental para caracterização de *Y. enterocolitica*, embora algumas amostras tivessem falhado na metabolização da uréia.

Outro fato a ser ressaltado é que não houve diferença quanto aos resultados obtidos, variando-se a temperatura de incubação, para a prova do Indol.

Um teste que consideramos muito importante para a definição das duas espécies de *Yersinia* é a capacidade de crescimento em presença de KCN. No que diz respeito a *Y. enterocolitica*, 100% das amostras foram negativas nessa prova, dados coincidentes com os de outros autores (4, 9, 15). No Manual de Bergey (1), no entanto, o resultado para esse substrato aparece como "d" (diferentes reações). Mais uma vez, assinala-se a contradição dos dados do Manual, pois Mollaret, que é um dos autores do capítulo de *Yersinia* apresenta em trabalho anterior (15) resultado negativo para essa prova.

Do mesmo modo, consideramos a descarboxilação da ornitina como uma das provas mais importantes na diferenciação de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*.

A prova da hidrólise da esculina é considerada por alguns autores como fundamental na diferenciação de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* (9, 11, 15, 18). Nossos resultados são discordantes. Embora 100% das reações tenham sido positivas para *Y. pseudotuberculosis*, dentro dos dois primeiros dias de incubação, também 93% das amostras de *Y. enterocolitica* apresentaram resultados positivos nessa prova, apesar de 58,1% dessas reações positivas aparecerem a partir do terceiro dia de incubação. As amostras estudadas por Darland & col. (4) também foram positivas, embora em porcentagens inferiores (36,0%). Acreditamos que isso se deve ao fato de termos estendido o tempo de leitura para vinte e um dias, enquanto aqueles autores o fizeram até o décimo quarto dia; ainda outros autores assinalam amostras de *Y. enterocolitica* capazes de hidrolisar a esculina (24, 34).

Resultados relativos à fermentação de carboidratos e compostos correlatos pelas amos-

tras de *Y. enterocolitica* apresentam muitas divergências, quando comparados aos de outros autores.

Os resultados da fermentação da lactose foram diferentes dos de Darland & col. (4) que observaram menos de 10% de reações positivas com leituras até o décimo quarto dia, às temperaturas de 22°C e 35-37°C. Obtivemos 25,5% de reações positivas de 35 a 37°C e, a 22°C, 72%. Destas apenas uma positivou-se dentro dos dois primeiros dias de incubação. Ressaltamos que a utilização da lactose realizou-se por via fermentativa e não oxidativa como relatado por Niléhn (24) e Wauters (34).

Observamos que 14% das amostras de *Y. enterocolitica* não fermentaram a sacarose. Alguns autores consideram essa prova como uma das fundamentais para diferenciar *Y. enterocolitica* de *Y. pseudotuberculosis* (11, 22). Entretanto, outros (24, 34), também assinalam resultados negativos em relação a esse teste.

Quanto à fermentação da salicina e arabinose, os resultados que aparecem no Manual de Bergey (1) divergem daqueles anteriormente relatados pelos autores que escreveram o capítulo de *Yersinia* no referido Manual (12, 15), sendo também discordantes dos nossos.

Os resultados de fermentação da xilose são semelhantes aos de alguns autores (11, 17) mas divergentes de outros (4), o mesmo acontecendo em relação à fermentação do inositol (4, 12, 15, 34).

Outra prova que gera controvérsia é a da fermentação da amidalina pelas amostras de *Y. enterocolitica*. Observamos 100% de resultados positivos, exatamente os mesmos assinalados por Darland & col. (4). O Manual de Bergey (1) apresenta essa reação como negativa. No entanto, Knapp & Thal (10) contestam que as amostras isoladas de lebres sejam consideradas como de *Y. enterocolitica*, entre outros motivos, por não acidificarem a amidalina. Para Mollaret & col. (15), essa prova é considerada positiva, exceto para aquelas amostras isoladas a partir de lebres. Frederiksen (9) apresenta diferentes tipos de reações para a amidalina.

Ao analisar a produção de gases a partir dos 30 substratos estudados, observa-se que as amostras de *Y. enterocolitica* produziram gases em 21 deles, em quantidades variáveis.

Encontramos poucas referências, na literatura, em relação à produção de gases por *Y. enterocolitica*. Niléhn (26) afirma que, usualmente, as bactérias dos biotipos 1 e 2 produzem gases a 22°C e 37°C e que as bactérias dos biotipos 3

e 4 formam gases, mais intensamente, a 25°C, enquanto as do biotipo 5 não produzem gases. Mostrou que amostras dos biotipos 3 e 4 formam gases a partir de manose, frutose, glicose, sacarose e manitol, de modo fraco e irregular; mas produzem quantidades maiores a partir de L-arabinose, galactose, maltose, trealose, cellobiose, sorbitol, glicerol e de D-xilose.

Alguns autores estudaram a formação de gases, principalmente a partir da glicose, com resultados diversos e contraditórios, sendo na maioria das vezes negativos. Assim, Darland & col. (4), Knapp & Thal (11), Mollaret & Thal (19) dão essa prova como negativa. Frederiksen (9) afirma que a produção de gases, a partir da glicose, é fraca e irregular, sendo mais pronunciada a 22°C que a 35-37°C, dados semelhantes aos nossos. Wauters (34) afirma que a produção de gases, a partir de glicose e a 22°C, é mais abundante e precoce em meio de cultura tamponado do que nos meios de cultura usualmente empregados para o estudo de fermentação e providos de tubo de Durhan.

Uma observação, que julgamos importante, é que a grande diversidade de resultados, frente ao mesmo substrato, relatada por diferentes autores que estudaram as espécies *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, pode ser devida a alguns fatores discutidos a seguir.

Em primeiro lugar, o fator temperatura de incubação motivou, em alguns testes, a positividade ou negatividade. Observamos, em alguns casos, a grande diferença de resultado frente a um mesmo substrato, variando-se a temperatura, quer para *Y. enterocolitica* quer para *Y. pseudotuberculosis*. Ela deve ser portanto, sempre constante no trabalho de caracterização dessas espécies bacterianas.

Outro elemento importante é o tempo de leitura, principalmente no que diz respeito à fermentação de carboidratos. Muitas das reações positivaram-se apenas na terceira semana de incubação. Realizando comparação de nossos dados com os relatados por outros autores, verifica-se que resultados divergentes apareceram em tempos diferentes de leitura. Em alguns desses trabalhos, o período de incubação foi menor que o nosso; em outros não há referência ao período de tempo em que o teste foi considerado positivo ou negativo.

A padronização de meios de cultura e reagentes é outro fator de importância. Empregando-se o mesmo substrato, em meios de cultura de constituição química muito diferente, ou pesquisando-se a presença de produtos de me-

tabolismo bacteriano com reativos diversos, os resultados serão provavelmente diferentes.

Analisando os diferentes testes bioquímicos, observamos que a presença da urease é um fator constante entre as amostras de *Y. enterocolitica* e de *Y. pseudotuberculosis*. Realizando uma revisão da presença dessa enzima em outras bactérias da família *Enterobacteriaceae*, observa-se que está presente em *Proteus*, *Klebsiella*, presente ou ausente em *Citrobacter*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter liquifaciens* e em *Serratia* (7). Por outro lado, nossos resultados constatam a existência de duas provas bioquímicas que diferenciam *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* das enterobactérias que possuem urease. São as provas da fenilalanina desaminase e do KCN, pois, das bactérias acima relacionadas, todas crescem em presença de KCN, sendo que *Proteus* também desamina a fenilalanina. Estes testes, portanto, foram sugeridos para diferenciar as duas espécies das demais enterobactérias.

Comparando os resultados que as amostras de *Y. enterocolitica* e de *Y. pseudotuberculosis* apresentaram no "Triple Sugar Iron" (TSI), com aqueles indicados por Edwards & Ewing (7), para as demais enterobactérias, verifica-se que podem ser confundidos com os resultados apresentados por *Escherichia coli* aerogênica ou anaerogênica, *Shigella*, *Providencia*, *Salmonella typhi* não produtora de H₂S, *Proteus morganii* e *Proteus rettgeri*.

A maior parte das amostras que estudamos deram, no TSI, ápice e base ácidos, reações essas semelhantes àquelas apresentadas por *Escherichia coli*. Em trabalho rotineiro, de identificação de enterobactérias, principalmente a partir de coproculturas, muitas amostras, quer de *Y. enterocolitica*, quer de *Y. pseudotuberculosis*, podem deixar de ser identificadas como tal, devido a essas características no "Triple Sugar Iron", confundindo-as com outras enterobactérias.

Referências Bibliográficas

1. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltimore, Willians & Wilkins, 1974.
2. Bottone, E. J.; Chester, B.; Malowany, M. S. & Allerhand, J. — Unusual *Yersinia enterocolitica* isolates not associated with mesenteric lymphadenitis. Appl. Microbiol., 27:858-861, 1974.
3. Chester, B. & Stotzky, G. — Temperature-dependent cultural and biochemical characteristics of rhamnose-positive *Yersinia enterocolitica*. J. Clin. Microbiol., 3: 119-127, 1976.
4. Darland, G.; Ewing, W. H. & Davis, B. R. — The biochemical characteristics of *Yersinia enterocolitica*, Atlanta, 1975. (U.S. Department of Health, Education and Welfare, Publication n° (CDC) 75-8294).
5. Desvignat, R. — Comportement biologique et biochimique de *P. pestis* et de *P. pseudotuberculosis*. Bull. wld. Hlth. Org., 10:463-494, 1954.
6. Edwards, P. R. & Ewing, W. H. — Identification of *Enterobacteriaceae*. 3rd ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972.
7. Eriksson, M. & Olcén, P. — Case Report. Septicaemia due to *Yersinia enterocolitica* in a non-compromised host. Scand. J. Infect. Dis., 7:78-80, 1975.
8. Ewing, W.H. & Davis, B.R. — Media and test for differentiation of *Enterobacteriaceae*. Atlanta, 1973. (U. S. Department of Health, Education and Welfare/Public Health Service Publication n° (CDC) 73-8236).
9. Frederiksen, W. — A study of some *Yersinia pseudotuberculosis* like bacteria. ("Bacterium enterocoliticum" and "Pasteurella X"). Scandinavian Congress on Pathology and Microbiology, 14º, Oslo, 1964. Proceedings, p. 103-104.
10. Knapp, W. & Thal, E. — Die biochemische charakterierung von *Yersinia enterocolitica* (Syn "Pasteurella X") als grundlage eines vereinfachten O-antigenschemas. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig., A223:88-105, 1973.
11. Knapp, W. & Thal, E. — Differentiation of *Yersinia enterocolitica* by biochemical reactions. In: International Symposium on *Yersinia*, *Pasteurella* and *Francisella*, Malmo, Apr. 10-12, 1972. Proceedings. Basel, S. Karger, 1973. p. 10-16.
12. Knapp, W. & Thal, E. — Untersuchungen über die kulturellbiochemischen, serologischen, tierexperimentellen und immunologischen Eigenschaften liner Vorläufig *Pasteurella* "X" banannten bakterienart. Zbt. Bak. Parasit. Infek. Hyg., 190:472-484, 1963.
13. Mollaret, H. H. — Contribution a l'étude des caractères biochimiques de *Pasteurella pseudotuberculosis*. (Bacille de Malassez et Vignal). Annls. Inst. Pasteur, 100: 685-690, 1961.
14. Mollaret, H. H. — La laboratoire dans le diagnostic d'infection humaine a Bacille de Malassez & Vignal. Gaz. Méd. Fr. 2-x:3457-3476, 1965.
15. Mollaret, H. H. & Chevalier, A. — Contribution a l'étude d'un nouveau groupe de germes proches du bacille de Malassez et Vignal. I — Caractères culturaux et biochimiques. Ann. Inst. Pasteur, 107:121-127, 1964.
16. Mollaret, H. H. & Knapp, W. — International Committee on Systematic bacteriology. Subcommittee on the Taxonomy of *Pasteurella*, *Yersinia* and *Francisella*. Int. J. Syst. Bacteriol., 22:401, 1972.
17. Mollaret, H. H. & Lucas, A. — Sur les particularités biochimiques des souches de *Yersinia enterocolitica* isolées chez les lièvres. Annls. Int. Pasteur, 108:121-125, 1965.
18. Mollaret, H. H.; Omland, T.; Henriksen, S. D.; Baerøe, P. R.; Rykner, G. & Scavizzi, M. — Les septicémies humaines a *Yersinia enterocolitica*. A propos de dix-sept cas récents. Presse Med., 79:345-348, 1971.
19. Mollaret, H. H. & Thal, E. — Genus XI. *Yersinia* van Loghem. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltimore, Willians & Wilkins, 1974, p. 330-333.
20. Negut, M. & Hermann, G. — A comparison of two methods for detecting Beta-D-Galactosidase. Publ. Hlth. Lab., 33:190-193, 1975.
21. Niléhn, B. — Bacteriological studies on 80 strains of *Yersinia enterocolitica* of human origin. In: Internatio-

- nal Symposium on *Pseudotuberculosis*, 20th, Paris, July 24-26, 1967. Proceedings. Basel, S. Karger, 1968, p. 327-336.
22. Niléhn, B. — Host range, temperature characteristics and serologic relationships among *Yersinia* phages. In: International Symposium on *Yersinia, Pasteurella* and *Francisella*, Malmo, Apr. 10-12, 1972. Proceedings. Basel, S. Karger, 1973, p. 59-67.
23. Niléhn, B. — Studies on *Yersinia enterocolitica*. Characterization of 28 strains from human and animal sources. Acta. path. microbiol. scand., 69:83-91, 1967.
24. Niléhn, B. — Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease. Acta path. microbiol. scand., (suppl. 206):1-48, 1969.
25. Niléhn, B. — Studies on *Yersinia enterocolitica*. Growth on various solid media at 37°C and 25°C. Acta path. microbiol. scand., 77:685-697, 1969.
26. Rabson, A.R. & Koornhof, H.J. — *Yersinia enterocolitica* Infections in South Africa. In: International Symposium on *Yersinia, Pasteurella* and *Francisella*, Malmo, Apr. 10-12, 1972. Proceedings. Basel, S. Karger, 1973, p. 102-105.
27. Schreier, J.B. — Modification of deoxyribonuclease test medium for rapid identification of *Serratia marcescens*. Amer. J. Clin. Path., 51:711-716, 1969.
28. Schütze, H. — *Bacterium pseudotuberculosis rodentium*. Rezeptorenanalyse von 18 stämmen. Arch. Hyg., 100:181-194, 1928.
29. Stevens, M. & Mair, N.S. — A numerical taxonomic study of *Yersinia enterocolitica* strains. In: International Symposium on *Yersinia, Pasteurella* and *Francisella*, Malmo, Apr., 10-12, 1972. Proceedings. Basel, S. Karger, 1973, p. 17-22.
30. Thal, E. — Untersuchungen Über *Pasteurella pseudotuberculosis*: unter besonderer Berücksichtigung ihres immunologischen Verhaltens. Lund. Aus dem Veterinärmedizinischen Staatsinstitut in Stockholm, 1954. [Thesis].
31. Toma, S. & Lafleur, L. — Survey on the incidence of *Yersinia enterocolitica* infection in Canada. Appl. Microbiol., 28:469-473, 1974.
32. van Noyen, R.; Isebaert, A. & Vandepitte, J. — Sur un biotype uréase négatif de *Yersinia enterocolitica*. Annls Inst. Pasteur, 117:658-662, 1969.
33. von Riesen, V.L. — Polypectate digestion by *Yersinia*. J. clin. Microbiol., 2:552-553, 1975.
34. Wauters, G. — Contribution a l'étude de *Yersinia enterocolitica*. Belgium, Universite Catholique de Louvain, 1970. [Thesis].

Interferência do radical nitrito na pesquisa da niacina em culturas de micobactérias*

Laerte de Andrade**
 & Lamartine Palhano Júnior***

Resumo

A pesquisa da niacina é o recurso mais usado para a diferenciação entre *M. tuberculosis* (positivo) e as demais micobactérias (negativas). Uma das técnicas mais empregadas com essa finalidade consiste no uso do tampão fosfato adicionado de nitrato de sódio que permite a execução simultânea do teste da niacina e da nitratorreductase a partir de uma mesma cultura. Entretanto, quando da realização do teste combinado, foram observadas falsas reações niacínicas em amostras de micobactérias atípicas. Os ensaios realizados demonstraram que a interferência foi causada pela presença de nitrito resultante da atividade nitratorreductásica das micobactérias. Recomenda-se a interpretação cuidadosa do teste combinado ou o emprego da técnica de Runyon para a pesquisa do ácido nicotínico.

Summary

Nitrite radical as interferent in niacin research in mycobacterial cultures

The research of niacin is the most important test for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* from atypical mycobacteria. The use of phosphate buffer with nitrate to test the production of niacin and nitrateductase in a single culture is one of them. However, some false niacin reactions have been observed in strains of atypical mycobacterial, due to the presence of nitrite radical. Several test were made in order to confirm the importance of this reaction and to clarify if it could prejudice the identification of *M. tuberculosis* by the niacin — nitrate combined test.

Introdução

A produção de várias vitaminas, inclusive altos níveis de ácido nicotínico (niacina), pelo *Mycobacterium tuberculosis* foi observada por alguns pesquisadores (2, 3, 8). Essa propriedade, evidenciada pela reação de Koenig (4), é utilizada para diferenciar o bacilo da tuberculose de outras micobactérias (5). O método original de Konno, utilizando a própria cultura, foi modificado por Runyon & col., que passaram a extrair a niacina com salina fisiológica (7). A utilização de tampão-fosfato, contendo nitrato de sódio, permitiu a realização, a partir de um mesmo tubo de cultura, dos testes da niacina e da nitratorreductase (6). Dentro do nosso sistema operacional, pode ser feita ainda a prova da catalase e de sua termoinativação, o que reduziu bastante a manipulação e o tempo utilizados na

identificação das micobactérias em trabalho de rotina (1). Com o uso deste último esquema na identificação bioquímica de amostras isoladas de materiais patológicos, principalmente de escharros, foram observadas reações positivas para niacina em culturas catalase termo-resistentes e portanto não consideradas como *M. tuberculosis*. Realizaram-se vários ensaios para esclarecer o verdadeiro significado dessas reações.

Material e Métodos

Microrganismos — Foram utilizadas amostras de *M. tuberculosis* (22), *M. flavescens* (2), *M. scrofulaceum* (3), *M. intracellulare* (4), *M. tri-viale* (3), *M. acapulcensis* (2) e *M. fortuitum* (25) da coleção do Laboratório Central de Tu-

* Trabalho realizado no Laboratório Central de Tuberculose (Rio de Janeiro), com a ajuda do CNPq.
 ** Da Divisão Nacional de Tuberculose e do CNPq.

*** Da Universidade Federal do Espírito Santo e da CAPES.

berculose (RJ), cultivadas em meio de Löwenstein-Jensen e testadas na fase logarítmica de crescimento.

Testes — Além do teste combinado de Kubica (6) foram realizados isoladamente as pesquisas da niacina e da nitratorreduktase.

Procedimentos — Para a realização do teste combinado, foi usado como substrato uma solução tampão-fosfato M/15, pH 7,0, adicionada de nitrato de sódio M/100, na proporção de 2 ml por tubo de cultura, utilizando-se 3 tubos para cada amostra. As culturas foram mantidas a 37°C, em posição inclinada de forma a permitir que a solução nitratada entrasse em contato com o crescimento bacteriano. Alíquotas de 0,15 ml e 0,5 ml do extrato foram retiradas em intervalos de 15 em 15 minutos na primeira hora, e após duas a três horas para os testes da niacina e nitratorreduktase, respectivamente.

Os reativos para a realização dos testes, assim como a interpretação dos mesmos, foram descritos em várias publicações (Andrade, 1968). Para a pesquisa da niacina, utilizou-se solução alcoólica de anilina a 4%.

Como controles, foram feitos testes com as seguintes soluções:

- Extrato do meio de cultura com tampão fosfato nitratado e não nitratado.
- Solução de nitrato de sódio a 0,1%.
- Solução de nitrito de sódio nas concentrações de 0,1, 0,01 e 0,001%.
- Solução de niacina a 0,0001% nitratada e não nitratada. Os reativos foram adicionados após manutenção dos tubos por duas horas a 37°C.

Resultados

Observou-se quando da utilização do método combinado que as amostras nitratorreduktase positivas de *M. tuberculosis*, *M. flavescent*, *M. triviale*, *M. terrae*, *M. acapsensis* e *M. fortuitum*, apresentaram positividade para o teste da niacina, enquanto que nas negativas (*M. scrofulaceum* e *M. intracellularare*) isso não foi constatado. Entretanto, com o método original de Runyon, somente as amostras de *M. tuberculosis* foram niacina positivo (Tabela 1). Através dos controles, verificou-se que a substância química que interferia, acarretando reações falso positivas para o ácido nicotínico, era o nitrito.

Tabela 1 — Pesquisa da niacina e nitratorreduktase em micobactérias pelos métodos original e combinado

Espécies	Amostras	Nitratorreduktase	Métodos de pesquisa da niacina							
			Original*		Combinado					
			15 min-3 hs	15 min.	30 min.	45 min.	1 h.	2 hs.	3 hs.	
<i>M. tuberculosis</i>	22	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>M. flavescent</i>	2	+	-	-	-	-	-	+	+	(+)
<i>M. triviale</i>	3	+	-	-	-	-	-	+	+	(+)
<i>M. terrae</i>	3	+	-	-	-	-	-	+	+	(+)
<i>M. acapsensis</i>	2	+	-	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>M. fortuitum</i>	25	+	-	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>M. scrofulaceum</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. intracellularare</i>	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* As reações foram iguais em todos os tempos de incubação;

— Reações negativas; + Reações positivas normais e (+) Reações positivas com alteração da cor

Nos tubos contendo nitrito de sódio foi observado o desenvolvimento de uma coloração amarela quando da adição das soluções de brometo de cianogênio e anilina, utilizadas para revelar a presença de niacina. Nas concentrações mais elevadas de nitrito (0,01% e 0,1%) foi verificada uma intensificação na coloração, que passou de amarela a vermelha escura em

poucos minutos, após adição dos reagentes. Isso foi também observado quando da aplicação do teste combinado em amostras nitratorreduktase positivas, particularmente nas de *M. tuberculosis* e *M. fortuitum*. A coloração amarela desenvolvida no teste niacínico positivo, usando-se o método original de Runyon, permaneceu estável.

Discussão

Kubica (6), na apresentação de seu método combinado para pesquisa da niacina e da nitratorreduktase, assinalou que a intensidade da cor, nos testes positivos da niacina, aumentava consideravelmente com o tempo de observação. Com os resultados obtidos, pode-se entender a causa de tal variação na cor. Quando as amostras de espécies sabidamente não niacinogênicas apresentaram reações positivas com o método combinado, suspeitou-se da existência de algum fator interferente, já que esse resultado não era confirmado pelo método original.

As reações controles mostraram que o nitrito formado a partir da atividade nitratorreduktásica era o fator interferente. Verificou-se que, em concentrações baixas (0,001%), o nitrito formado pode provocar uma falsa positividade. Na reação com a niacina pura e na pesquisa da niacina em cultura do bacilo da tuberculose pelo método original, a cor amarela, que se desenvolve em 5 minutos, é estável, o mesmo não ocorrendo na presença de nitrito, quando passa

do amarelo ao vermelho escuro, depois de alguns minutos. Esta observação vem confirmar as observações de Kubica (6) sobre a intensificação da cor em culturas de *M. tuberculosis*. Esse microrganismo é capaz de reduzir rapidamente o nitrato. O aparecimento da reação falso positiva está relacionada com o tempo que a amostra leva para reduzir o nitrato e com a concentração do nitrito formado.

A princípio acreditou-se que havia uma mistura de *M. tuberculosis* e micobactérias atípicas em amostras isoladas de escarro na rotina dos serviços do Laboratório Central de Tuberculose, ocasionando dúvidas na interpretação dos resultados, já que as culturas apresentavam-se niacinogênicas e catalase termo-resistentes ao mesmo tempo. Em vista dessas observações, sugere-se o seguinte método para as pesquisas da niacina e da nitratorreduktase, de forma a aproveitar o mesmo tubo de cultura para os dois testes: 1 — extraír a niacina com salina fisiológica por 15 minutos, 2 — depois de retirar a alíquota para o teste da niacina, acrescentar o tampão fosfato com nitrato, incubar e pesquisar a presença do nitrito.

Referências Bibliográficas

1. Andrade, L. — Identificação bioquímica rápida do bacilo da tuberculose em cultura primária. Niacina, catalase à temperatura ambiente, termoinativação da catalase e nitratorreduktase. Rev. Serv. Nac. Tuberc. (Rio de Janeiro), 12(46):125-156, 1968.
2. Bird, O.D. — Vitamin content of tubercle bacilli. Nature (London), 159:33, 1947.
3. Boissevain, C. H.; Drea, W. F. & Schluts, H. W. — Isolation and determination of riboflavin produced by tubercle bacilli in culture media. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 39:481-485, 1938.
4. Koenig, W. — Ueber eine neue, von pyridin derivierende Klasse von farbstoffen. J. Prakt. Chemie., 69:105-137, 1904.
5. Konno, K. — New chemical method to differentiate human-type tubercle bacilli from other mycobacteria. Science, 124:985, 1956.
6. Kubica, G. P. — A combined niacin-nitrate reduction test for use in the identification of mycobacteria. Acta Tuberc. Scand., 45(2-3):161-167, 1964.
7. Runyon, E. H.; Selin, M. Y. & Harris, H. W. — Distinguishing mycobacteria by the niacin test: a modified procedure. Am. Rev. Tuberc. Dis., 79:663-665, 1959.
8. Pope, H. & Smith, D. T. — Synthesis of B-complex vitamins by tubercle bacilli when grown on synthetic media. Am. Rev. Tuberc., 54:559-563, 1946.

**Micobactérias atípicas isoladas de material humano na cidade do Rio de Janeiro.
I — Identificação preliminar pela morfologia colonial***

Leila de Souza Fonseca
& Paulo Pinto Gontijo Filho

Resumo

Estudo da morfologia colonial em 144 amostras de micobactérias atípicas, isoladas pelo Laboratório Central de Tuberculose do Rio de Janeiro, na maioria provenientes de escarro de pacientes supostamente tuberculosos. A morfologia colonial, em meio transparente de Dubos (Agar Dubos Oleico Albumina), apresentou 72% de correlação com os resultados obtidos através da identificação bioquímica, sugerindo sua utilização na identificação preliminar de micobactérias.

Summary

Atypical mycobacteria isolated from human sources in Rio de Janeiro. I — Preliminary identification by colony characteristics

Colony characteristics of 144 strains of atypical mycobacteria isolated by the Laboratório Central de Tuberculose do Rio de Janeiro, mainly from sputum of patients suspected of having tuberculosis, were analysed. The colony morphologies on transparent albumin oleic agar medium have showed 72% correlation of with biochemical identification suggesting this procedure as an aid in presumptive identification of mycobacteria.

Introdução

A importância de micobactérias atípicas na patologia humana foi reconhecida há poucas décadas. Em 1938, Cruz (5) relatou um caso de infecção por micobactéria atípica, no Rio de Janeiro, mas somente após a publicação de dois casos fatais de doença pulmonar humana, por micobactérias fotocromogênicas (4), foram acumuladas evidências que esses microrganismos são capazes de produzir doença no homem (6, 9, 10, 12, 22).

No Brasil, levantamento sobre a prevalência dessas micobacterioses foram realizadas por Magarão & Lorian (15), Magalhães (13) e Magalhães, Campo & Guerra (14). Na cidade do Rio de Janeiro, Andrade & Santiago (3) relataram 2% de isolamento de micobactérias atípicas, entre as micobactérias isoladas pelo Laboratório de Tuberculose do Rio de Janeiro, com

predominância de micobactérias de crescimento rápido.

O objetivo do presente trabalho é avaliar o emprego da morfologia colonial na identificação preliminar de espécies patogênicas ou potencialmente patogênicas para o homem, isoladas de material clínico na cidade do Rio de Janeiro.

Material e Métodos

Amostras utilizadas — Foram utilizadas 144 amostras, do Laboratório Central de Tuberculose do Rio de Janeiro (Laboratório de Referência da Campanha Nacional contra a Tuberculose), isoladas de pacientes supostamente tuberculosos. Cerca de 74% dos isolamentos foi de escarro (Tabela 1), de pacientes internados ou em tratamento dispensarial.

* Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia da UFRJ, com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FINEP e CEPG da UFRJ.

Tabela 1 — Distribuição das amostras, de acordo com a origem

Material	Nº de amostras	Percentagem
Escarro	106	73,6
Lavado brônquico	12	8,3
Urina	11	7,6
Lavado gástrico	8	5,6
Outros	7	4,9
TOTAL	144	100

As culturas não tiveram o comportamento de *Mycobacterium tuberculosis* nem de *Mycobacterium bovis*, quando submetidas aos seguintes testes: presença de ácido nicotínico, redução de nitrato, atividade catalásica à temperatura ambiente e a 68°C, como é feito de rotina naquele laboratório (1).

Adicionalmente, foram utilizadas 21 amostras-tipo das diferentes espécies do gênero *Mycobacterium*.

Morfologia colonial — As amostras inicialmente foram cultivadas no meio líquido de Dubos e

posteriormente, utilizando-se alça de platina, semeadas em placas, contendo meio agar Dubos oleico albumina.

As placas foram mantidas, em posição invertida, a 37°C e observadas com 2, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de incubação.

A observação foi feita com microscópio estereoscópico, utilizando-se aumento de 12X, 48X e 96X. As colônias foram descritas segundo os critérios de Fregnan & Smith (8).

Resultados

Na Tabela 2 estão relacionados os tipos coloniais, apresentados pelas micobactérias no meio agar Dubos oleico albumina. Os diversos tipos, assim como a descrição das colônias, são mostrados nas Figuras 1 a 9.

A correlação entre as identificações pelos testes bioquímicos (7) e morfologia colonial foi de 72%. Trinta e nove amostras apresentaram tipos de colônias diversos dos descritos para as respectivas espécies (Tabela 3).

Tabela 2 — Tipos de colônias comumente apresentadas pelas espécies do gênero *Mycobacterium**.

Grupo de Runyon	Espécie	Tipo de colônia
I	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i>	R-Cs, R-R R-R
II	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i>	Sm-K, Sm-Kw Sm-K, Sm-Kw
III	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. gordonaë</i> <i>M. flavescens</i>	Sm-Sy, R-Ry, Sm-ly Sm-Sy, R-Ry, Sm-ly Sm-Sy, Sm-Dy, Sm-ly
IV	<i>M. xenopi</i> <i>M. avium-intracellulare</i> <i>M. gastri</i> <i>M. terrae</i> <i>M. triviale</i>	Xf Sm-S, Sm-D, Sm-I, Sm-T Sm-K, Sm-T, Sm-S Sm T, Sm K, Sm S R-R, Sm-K
	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonei</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. phlei</i> <i>M. diernhoferi</i>	Xf Sm-S Sm-K, Sm-Kw, R-R R R Sm-D, Sm-S

* Pattyn & Portaeels (17)

Figura 1 — Colônia "Rough-Cs" — estrutura em serpentina, com filamentos paralelos formando curvas que se irradiam do centro para a periferia: bordo ondulado. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 10C-262, 40X

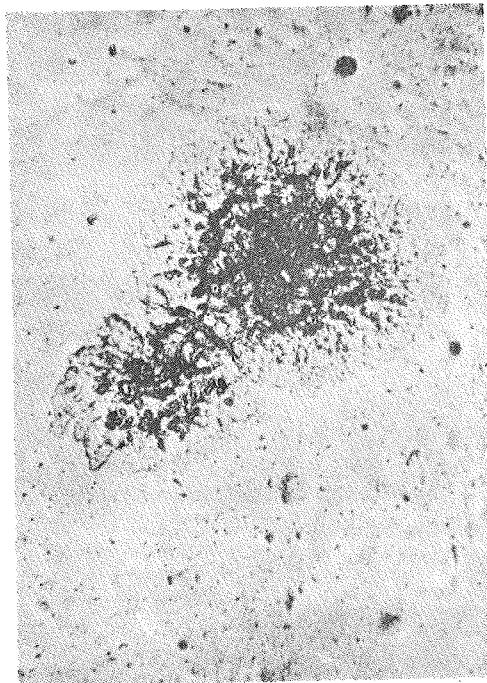


Figura 3 — Colônia 'Smooth-K' — chata, com superfície ligeiramente ondulada, e ponto preto visível na parte central. *Mycobacterium kansasii* ATCC-12.478, 40X



Figura 2 — Colônia "Rough-R" — estrutura com filamentos visíveis apenas na periferia: bordo irregular. *Mycobacterium triviale* ATCC-23.292, 40X

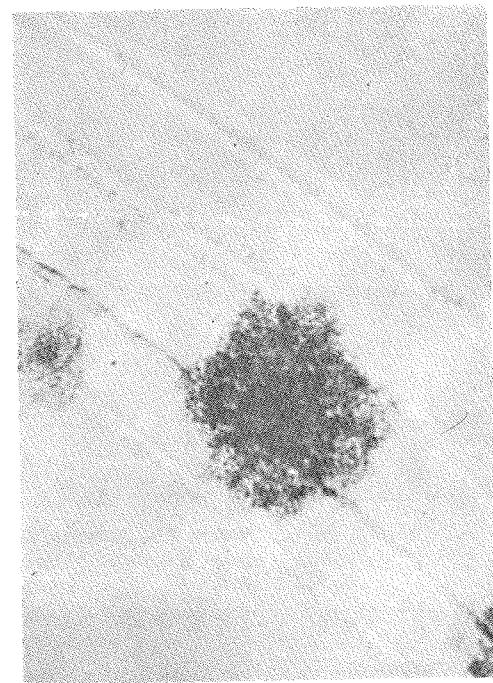


Figura 4 — Colônia "Smooth-Kw" — chata, com superfície enrugada, filamentos irradiando-se do centro para a periferia: bordo irregular. *Mycobacterium vaccae* ATCC-15.483, 40X

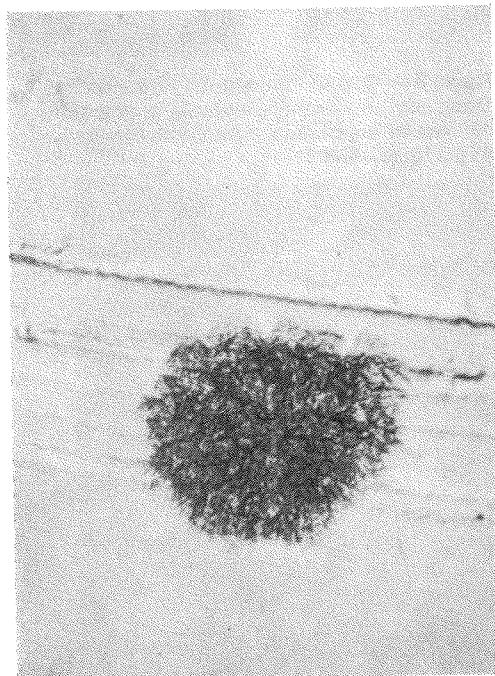


Figura 5 — Colônia “Smooth-S” — cúpula central que se torna chata na periferia; bordo ondulado. *Mycobacterium avium* ATCC-25.291, 40X

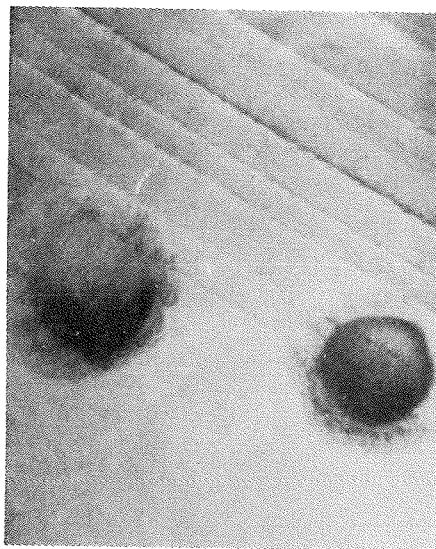


Figura 6 — Colônia “Smooth-D” — superfície em forma de cúpula, com bordo redondo e íntegro. *Mycobacterium intracellulare* ATCC-15.985, 40X

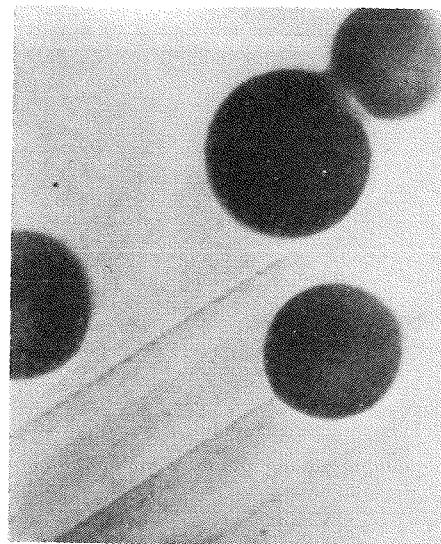


Figura 7 — Colônia “Smooth-I” — presença simultânea de colônia “Smooth-S” e “Smooth-D”. *Mycobacterium phlei* ATCC-10.142, 40X

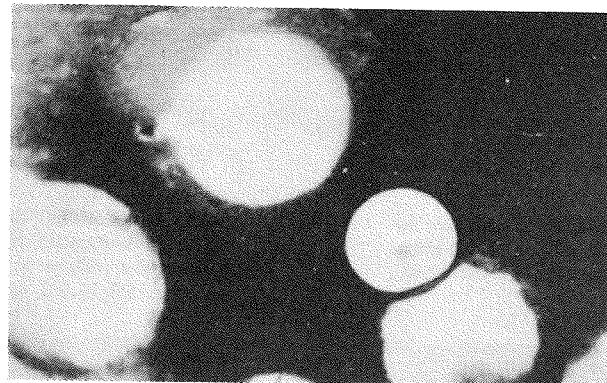


Figura 8 — Colônia “Smooth-T” — transporta, chata, com uma pequena elevação central; bordo irregular e ondulado. *Mycobacterium terrae* ATCC-15.755, 40X

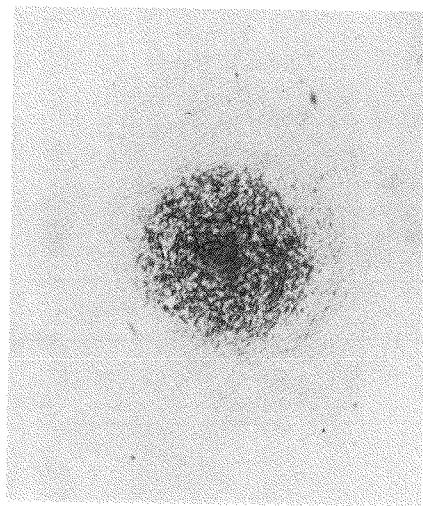


Figura 9 — Colônia “XF” — cúpula central e extensa rede filamentosa na periferia. *Mycobacterium fortuitum* ATCC-6841, 40X

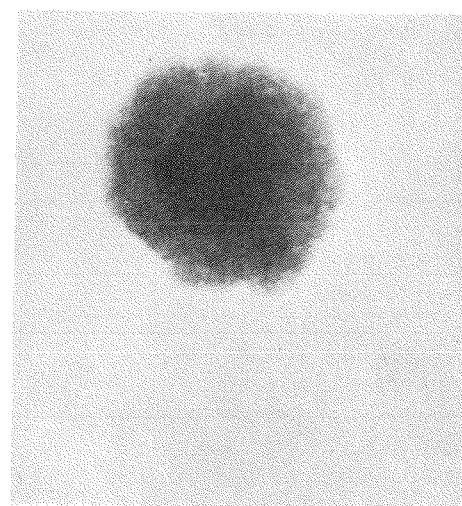


Tabela 3 — Correlação entre as identificações realizadas através de testes bioquímicos e morfologia colonial

Grupo de Runyon	Espécie	Nº de amostras com morfologia colonial		Total
		Concordantes	Discordantes	
I	<i>M. kansasii</i>	6	2	8
II	<i>M. scrofulaceum</i>	20	4	24
	<i>M. gordonaee</i>	3	4	7
	<i>M. flavescentis</i>	13	8	21
III	<i>M. avium-intracellulare</i>	13	3	16
	<i>M. gastri</i>	9	7	16
	<i>M. terrae</i>	9	1	10
	<i>M. triviale</i>	1	1	2
IV	<i>M. fortuitum</i>	20	6	26
	<i>M. vaccae</i>	4	—	4
	<i>M. diernhoferi</i>	—	3	3
	TOTAL	98(72%)	39(28%)	137(100%)

Discussão

O significado clínico do isolamento de micobactérias atípicas de material patológico é hoje amplamente reconhecido. Inquéritos epidemiológicos, para estabelecer a incidência desses microrganismos, têm sido realizados, praticamente, em todas as regiões do mundo. Esses estudos apontam proporções oscilantes de 0 a 47%, em relação ao total de micobactérias isoladas (3).

No Brasil, diversos levantamentos foram realizados por Magalhães (13), Magalhães & col. (14) em Recife e Silveira & col. (21), na Bahia, revelando prevalências de 0,8%, 0,9% e 3,5% respectivamente. Magalhães & Lorian (15), Andrade & Santiago (3) e Andrade (2) obtiveram aproximadamente 2% de micobactérias atípicas entre os isolamentos realizados no Laboratório Central de Tuberculose, localizado no Rio de Janeiro. As amostras utilizadas no trabalho foram provenientes dessa Instituição.

O estudo da morfologia colonial não tem sido utilizado pelos Laboratórios de Patologia Clínica, embora possa proporcionar a identificação preliminar das amostras isoladas, em tempo relativamente curto, quando realizado criteriosamente (17, 19).

A maioria das espécies patogênicas, incluindo *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. fortuitum* e *M. chelonei*, pode ser reconhecida através de suas colônias. No entanto, para outras, como *M. scrofulaceum* e *M. avium-intracellularare*, o estudo da morfologia colonial apresenta valor limitado (17, 18, 19).

Segundo Kubica & Jones (11) e Pattyn & Portaels (17), *M. kansasii* produz colônias de rugosidade intermediária, descritas como "Smooth-K" e "Smooth-Kw". Contudo, Runyon (19) comenta que essa propriedade pode ser variável, com algumas amostras apresentando colônias rugosas. Em nosso trabalho, de oito amostras de *M. kansasii* estudadas, seis (75%) forneceram colônias típicas ("Smooth-K" e "Smooth-Kw") e duas, colônias rugosas.

As micobactérias escotocromogênicas, de crescimento lento, não apresentam colônias características, que permitam distinguir as espécies patogênicas (18). Essas bactérias produzem colônias lisas, pigmentadas, descritas como "Smooth-Sy", "Smooth-Dy" e "Smooth-ly" (11, 20). Entretanto, colônias rugosas podem ser ocasionalmente observadas (11). Analisando nossos resultados, verificamos que 69,3% das colônias produzidas por esse grupo foram lisas ("Smooth-Sy", "Smooth-Dy" e "Smooth-ly") e 30,7% rugosas.

M. avium-intracellularare possui colônias transparentes e difíceis de serem visualizadas ("Smooth-T"), mas outros tipos, como "Smooth-S", "Smooth-D" ou "Smooth-I", podem ser observados. As espécies não patogênicas do grupo III de Runyon produzem, freqüentemente, colônias semelhantes às de *M. kansasii*, mas podem ser encontradas colônias idênticas às de *M. avium-intracellularare*, fazendo-se necessário testes bioquímicos para diferenciação (18).

M. xenopi é a espécie mais facilmente caracterizada pela morfologia colonial. Suas colônias

possuem filamentos, projetando-se das bordas, semelhantes aos produzidos por *M. fortuitum*. Entretanto, as colônias de *M. xenopi* apresentam pigmento amarelo, o que permite fácil distinção de *M. fortuitum* (18, 19).

Encontramos 72,7% das amostras do grupo III, fornecendo colônias lisas, coerente com os dados encontrados na literatura para micobactérias não cromogênicas, de crescimento lento e comentados acima (17, 19).

M. fortuitum produz colônias filamentosas, que aparecem na superfície do meio em menos de uma semana (18). A morfologia colonial dessa micobactéria pode variar, de acordo com o

meio de cultura utilizado, exibindo filamentos proeminentes em "corn-meal-agar", enquanto em 7H10 e agar oleico albumina os filamentos não são extensos, sendo comum a observação de colônias com bordas regulares (16, 17, 18). A maioria (76,9%) das amostras de *M. fortuitum* estudadas exibiu colônias filamentosas, descritas como "Xf".

As colônias de *M. chelonei* são facilmente diferenciadas das produzidas por *M. fortuitum*, por não apresentarem filamentos na periferia e, além disso, por serem chatas e ligeiramente transparentes (18, 19).

Referências Bibliográficas

1. Andrade, L. — Identificação bioquímica rápida do bacilo da tuberculose em cultura primária — niacina, catalase à temperatura ambiente, termoinativação da catalase e nitrorreduktase. Rev. Serv. Nac. Tuber., 12:125-156, 1968.
2. Andrade, L. — Micobacteriose no Brasil. Apresentado à mesa redonda "Micobacteriose na América Latina" no VI Congresso Latino Americano e 1º Venezuelano de Microbiologia em Caracas de 1 a 7/12/1974, 1974.
3. Andrade, L. & Santiago, A.C. — Micobactérias atípicas na Guanabara. Rev. Serv. Nac. Tuber., 15:124-145, 1971.
4. Buhler, V.B. & Pollack, A. — Human infection with atypical acidfast organisms. Report of two cases with pathologic findings. Amer. J. Clin. Pathol., 23:363-364, 1953.
5. Cruz, J.C. — *Mycobacterium fortuitum* um novo bacilo ácido resistente patogênico para o homem. Acta Med. (Rio de Janeiro), 1:297-301, 1938.
6. Edwards, F.G.B. — Disease caused by "atypical" (opportunist) mycobacteria a whole population: review. Tubercl., 51:285-295, 1970.
7. Fonseca, L.S. & Gontijo Fº, P.P. — Micobactérias atípicas isoladas de material humano na cidade do Rio de Janeiro. II — Identificação bioquímica e espectro de resistência aos tuberculostáticos. Rev. Microbiol. (São Paulo), 9(3):149-155, 1978.
8. Fregnan, G.B. & Smith, D.W. — Description of various colony forms of mycobacteria. J. Bacteriol., 83: 819-827, 1962.
9. Hobby, G.L.; Redmond, W.B.; Runyon, E.H.; Schaefer, W.B.; Wayne, L.G. & Wichelhausen, R.H. — A study on pulmonary disease associated with mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: identification and characterization of mycobacteria. Amer. Rev. Resp. Dis., 95:954-971, 1967.
10. Kahana, L.M.; Richardson, H. & Cole, F.M. — Clinical aspects of atypical mycobacterial infections. Can. Med. Ass. J., 112:321-324, 1975.
11. Kubica, G.P. & Jones Jr., W.O. — Differential colonial characteristics of mycobacteria on oleic-acid-albumin and modified corn meal agars. I — Investigation of slowly growing mycobacteria. Zentralb. Bakteriol. Parasitk. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig., 196:53-67, 1965.
12. Lincoln, E.M. & Gilbert, L.A. — Disease in children due to mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*. Amer. Rev. Resp. Dis., 105:683-714, 1972.
13. Magalhães, M. — Freqüência das micobactérias atípicas no Recife. Rev. Serv. Nac. Tuber., 10:217-223, 1966.
14. Magalhães, M.; Campos, G. & Guerra, T. — Bacteriological study on atypical mycobacteria associated with man. Rev. Microbiol. (São Paulo), 3:85-89, 1972.
15. Magarão, M.F. & Lorian, V. — Des mycobactérias anormales dans notre pratique pneumologique. Acta Tuber. Scand., 51:252-259, 1962.
16. Palhano Jr., L. — *Mycobacterium fortuitum*. Aspectos bacteriológicos bioquímicos, imunológicos e patogenicidade para o homem e animais de laboratório. Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1975. (Tese de Mestrado).
17. Pattyn, S.R. & Portaels, F. — Identification and clinical significance of Mycobacteria. Zentralb. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig., 219:114-140, 1972.
18. Runyon, E.H. — Identification of acid-fast pathogens utilizing colony characteristics. 2nd ed. Veterans Administration, 1969.
19. Runyon, E.H. — Identification pathogens utilizing colony characteristics. Amer. J. Clin. Path., 54:578-586, 1970.
20. Runyon, E.H.; Karson, A.G.; Kubica, G.P. & Wayne, L.G. — *Mycobacterium*. Manual of Clinical Microbiology, p. 148-174. 2nd ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1974.
21. Silveira, J.; Darzins, E. & Matos, A.V. — Micobactérias apatógenas isoladas no escarro, lavado gástrico e lavado brônquico. Arq. Inst. Bras. Invest. Tuber. (Salvador), 10:143-154, 1951.
22. Timpe, A. & Runyon, E.H. — The relationships of atypical acidfast bacteria to human disease. J. Lab. Clin. Med., 44:202-209, 1954.

**Comportamento bioquímico de amostras
de *Citrobacter diversus* (*Levinea malonatica*)
e *Levinea amalonatica*
isoladas de material clínico humano***

Ivone Rocco Suassuna
José Renaldi F. Brito
Ítalo Suassuna
& Rosa Maria C. Ferreira

Resumo

Descrição do comportamento bioquímico de 70 amostras isoladas de várias patologias humanas. Foram utilizados 37 testes comumente empregados para a identificação de germes da família *Enterobacteriaceae*, acrescidos da prova de degradação da tirosina, recentemente introduzida no estudo de enterobactérias. Foram reconhecidas 55 amostras de *Citrobacter diversus*, 12 de *L. amalonatica* e três de comportamento bioquímico intermediário entre as duas primeiras. Os testes considerados de maior valor diferencial entre *C. diversus* e *L. amalonatica* foram a utilização do malonato de sódio, a fermentação do adonitol, o crescimento em presença de cianeto de potássio (KCN) e a degradação da tirosina. Os resultados obtidos estão de acordo com a proposta de reunir *C. diversus* e *L. malonatica* em uma única espécie denominada *C. diversus*, permanecendo a designação de *L. amalonatica* para a nova espécie até que seja definida a legitimidade deste nome.

Summary

Biochemical behavior of Citrobacter diversus (Levinea malonatica) and Levinea amalonatica isolated from human's clinical samples

Description of the behavior of 70 strains isolated from human patients. Thirty seven tests — generally used in the identification of *Enterobacteriaceae* plus a recently introduced test — tyrosine degradation — were explored. Fifty five strains of *C. diversus*, 12 of *L. amalonatica* and three strains intermediate between these species were identified. Tests of differential value were: the utilization of sodium malonate, fermentation of adonitol, growth in presence of KCN and degradation of tyrosine. The results agree with the proposal of bringing *C. diversus* and *L. malonatica* into a single specie, *C. diversus*. The designation *L. amalonatica* would stand for a new specie until the legitimacy of such name is recognized.

Introdução

Diversos autores têm descrito amostras bacterianas, semelhantes a *Citrobacter freundii*, mas que diferem em algumas reações bioquímicas. Macierewicz (14) sugeriu um novo gênero, *Padlewskia*, após o estudo de 27 amostras. Frederiksen (8) descreveu um grupo de amostras que pertenciam ao gênero *Citrobacter*, mas diferiam de *C. freundii* porque fermentavam o adonitol, utilizavam o malonato, produziam indol e não cresciham em presença de cianeto de potássio (KCN). Essas amostras revelaram fra- ca produção de gás sulfídrico (H_2S), em meio de gelatina-cloreto férrico. O autor sugeriu que deveriam representar uma nova espécie, sob a

designação de *C. koseri*. Booth & McDonald (4) chegaram à mesma conclusão, após o estudo de 40 amostras similares.

Em 1971, Young & col. (24) descreveram as características bioquímicas de 108 amostras e propuseram a criação de um novo gênero, *Levinea*, com duas espécies: *L. malonatica* e *L. amalonatica*. As reações bioquímicas de *L. malonatica* eram semelhantes às de *C. koseri*, mas a produção de H_2S , em meio de tríplice açúcar-ferro (TSI), não era detectada. As reações bioquímicas de *L. amalonatica* mostravam semelhanças às de espécie do gênero *Padlewskia*.

Em revisão feita em 1972, Ewing & Davis consideraram que os nomes propostos por Frederiksen (8) e Young & col. (24) eram legítimos

* Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia da UFRJ, com auxílio financeiro do CNPq, EMBRAPA, FINEP e CEPG.

e validamente publicados, mas os nomes de espécies propostos para o gênero *Citrobacter*, por Werkman & Gillen (23), tinham prioridade, sendo sugerida a denominação de *C. diversus* para as amostras que apresentassem comportamento bioquímico semelhante a *C. koseri* e *L. malonatica*.

A partir de 1972, crescente número de pesquisadores vem relatando o isolamento de microrganismos de comportamento bioquímico semelhante aos citados, com divergência de opiniões quanto à designação de gêneros e espécies.

Richard & col. (18) descreveram características bioquímicas de 63 amostras assim classificadas: 49 *L. malonatica*, oito *L. amalonatica* e seis intermediárias entre estas espécies. Os autores propuseram esquema de classificação com seis biotipos (a - f), através da fermentação de ramnose, sorbose sacarose e dulcitol. Gross & col. (10) relataram a ocorrência de dois distintos bio-sorotipos para as amostras fermentadoras e não fermentadoras da sacarose, da mesma espécie de *C. koseri*, incluídas em seu estudo. Em 1973, Sedlak estudou diversos aspectos, incluindo classificação sistemática, estrutura antigênica, ecologia, imunoquímica e sensibilidade a antibióticos, bacteriófagos e bacteriocinas, referentes ao gênero *Citrobacter*, reconhecendo duas espécies, *C. freundii* e *C. intermedium*. Gross & Rowe (9) observaram que *L. amalonatica* diferia bioquímica e sorologicamente de amostras de *C. koseri* e *L. malonatica*. Lund & col. (13) estudaram 75 amostras de *Citrobacter* não produtoras de H₂S, das quais 24 foram caracterizadas como *C. freundii* e 51 como *C. diversus*. Aldova & Sourek (1) relataram o primeiro isolamento de culturas *Levinea-Citrobacter* na Tchecoslováquia, através de estudos de 22 amostras com bioquímica pertinente. Madrazo & col. (15, 16) relataram o isolamento de amostras de *C. diversus* a partir de pacientes humanos. Richard (17) e Van Oye (22) descreveram características bioquímicas de *Levinea*; Rowe & col. (19) realizaram estudos bioquímicos e sorológicos com amostras de *C. koseri* isoladas de espécies clínicas de origem humana. Altmann & col. (2) identificaram, bioquimicamente, amostras de *C. diversus* isoladas de materiais clínicos humanos.

Neste trabalho, estudamos os caracteres bioquímicos de 70 amostras bacterianas de materiais clínicos de origem humana, na cidade do Rio de Janeiro, para a observação de seu comportamento, em confronto com o de amostras-

padrão de *C. diversus*, *L. malonatica* e *L. amalonatica* e também como tentativa de sua utilização para classificação dessas bactérias.

Material e Métodos

Origem das amostras — cultivos mantidos em meio de agar nutritivo, no Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Do total de 75 amostras, 70 foram isoladas de material clínico humano, em laboratório clínico particular. Destas, 43 foram isoladas de urina; 12 de fezes; quatro de secreção traqueobrônquica; uma de secreção de incisão cirúrgica; uma de sangue; uma de fossa nasal e uma de líquido seminal. Não se obteve informações sobre a fonte de isolamento de sete amostras. As cinco outras eram amostras-tipo, da "American Type Culture Collection" (ATCC): *C. diversus* (27156), *L. malonatica* (25408), *L. amalonatica* (25405); e da "National Collection of Type Culture" (NCTC): *L. malonatica* (10810) e *L. amalonatica* (10805).

Estudos dos caracteres bioquímicos — Inicialmente, as amostras foram semeadas em meio EMB-agar, segundo técnicas de Holt Harris & Teague (11), Levine, (12) e do Difco Manual (5). Verificada a pureza, através da observação macroscópica do aspecto colonial e da microscopia de esfregaços corados pelo método de Gram, foram feitas semeaduras nos meios de triagem; tríplice açúcar-ferro (TSI) e meio SIM (dos laboratórios Difco e BBL), em que se observou a produção de H₂S, de indol e a mobilidade. Ao mesmo tempo, foram realizados as seguintes provas: utilização de arabinose, ramnose, frutose, glicose, sorbose, cellobiose, lactose, sacarose, rafinose, glicerol, eritritol, adonitol, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, esculina e salicina; determinação do tipo de metabolismo da glicose (fermentativo ou oxidativo), em meio de Hugh & Leifson; atividade da betagalactosidase (ONPG); a hidrólise da uréia, nos meios de Christensen e Stuart; prova de vermelho de metila (VM) e Voges & Proskauer (VP); crescimento em presença de cianeto de potássio (KCN); hidrólise da gelatina; descarboxilação da lisina e da ornitina; pesquisa da arginina-dihidrolase; utilização do citrato de sódio em meio mineral; utilização do malonato de sódio; degradação da tirosina; redução do nitrato; a

desaminação da fenil-alanina (1-aminoácido-oxidase) e prova da citocromo-oxidase.

Para o preparo, inoculação e leitura dos testes utilizados, foram seguidas as recomendações de Edwards & Ewing (6). O teste de degradação da tirosina foi realizado de acordo com Sheth & Kurup (21).

Resultados

O resultado dos testes bioquímicos realizados com as amostras-padrão de *C. diversus*, *L. malonatica* e *L. amalonatica* está na Tabela 1.

Tabela 1 — Comportamento bioquímico de cinco amostras-padrão de *Citrobacter diversus*, *Levinea malonatica* e *Levinea amalonatica*

Teste ou substrato	<i>C. diversus</i> ATCC 27156	<i>L. malonatica</i> ATCC 25408	<i>L. malonatica</i> NCTC 10810	<i>L. amalonatica</i> ATCC 25405	<i>L. amalonatica</i> NCTC 10805
H ₂ S (TSI)	-	-	-	-	-
Indol	+	+	+	+	+
Mobilidade	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-
KCN	-	-	-	-	-
Gelatina	-	-	-	-	-
Lisina	-	-	-	+	+
Ornitina	+	+	+	+	-
Arginina	-	-	-	-	-
Tirosina	-	+	+	-	-
L-aminoácido-oxidase	-	-	-	-	-
Metab. fermentativo Hugh & Leifson	+	-	+	+	+
Arabinose	A	A	A	A	A
Ramnose	A	A	A	A	A
Frutose	A	A	A	A	A
Glicose	AG	AG	AG	AG	AG
Sorbose	A*	-	A*	A	A
Cellobiose	A	A	A	A	-
Lactose	A*	-	A*	-	-
Sacarose	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-
Glicerol	AG	AG	AG	A*	AG*
Eritritol	-	-	-	-	-
Adonitol	A	A	A	-	-
Dulcitol	A	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
Manitol	A	A	A	A	A
Sorbitol	A	A	A	-	A*
Esculina	A*	A*	A*	-	A*
Salicina	A*	A*	A*	A	A*
ONPG	+	+	+	+	+
VM	+	+	+	-	-
VP	-	-	-	-	-
Uréia (Stuart)	-	-	-	-	-
Uréia (Christensen)	+*	+*	+	-	-
Citrato (Simmons)	+	+	+	+*	+
Malonato de sódio	+	+	+	-	-

+= positivo

- = negativo

A= Ácido

G= gás

*= positividade após 48 horas

Tabela 2 — Comportamento bioquímico de 55 amostras de *Citrobacter diversus* e 12 de *Levinea amalonatica*

Teste ou substrato	<i>C. diversus</i>						<i>L. amalonatica</i>					
	+	%	(+)	%	-	%	+	%	(+)	-	%	
H ₂ S (TSI)	0	-	0	-	55	100,0	0	-	0	-	-	12 100,0
Indol	55	100,0	0	-	0	-	10	83,3	0	-	2	16,7
Mobilidade	54	98,2	0	-	1	1,8	12	100,0	0	-	0	-
Nitrato	55	100,0	0	-	0	-	12	100,0	0	-	0	-
Oxidase	0	-	0	-	55	100,0	0	-	0	-	0	-
KCN	0	-	0	-	55	100,0	10	83,3	0	-	2	16,7
Gelatina	0	-	0	-	55	100,0	0	-	0	-	12	100,0
Lisina	0	-	0	-	55	100,0	1	8,3	0	-	11	91,7
Ornitina	55	100,0	0	-	0	-	11	91,7	1	8,3	0	-
Arginina	0	-	0	-	55	100,0	0	-	0	-	12	100,0
Tirosina	54	98,2	0	-	1	1,8	1	8,3	0	-	11	91,7
L-aminoácido-oxidase	0	-	0	-	55	100,0	0	-	0	-	12	100,0
Metab. fermentativo Hugh & Leifson	55	100,0	0	-	0	-	12	100,0	0	-	0	-
Arabinose	55	100,0	0	-	0	-	12	100,0	0	-	0	-
Ramnose	54	98,2	1	1,8	0	-	12	100,0	0	-	0	-
Frutose	55	100,0	0	-	0	-	12	100,0	0	-	0	-
Glicose (ácido + gás)	55	100,0	0	-	0	-	12	100,0	0	-	0	-
Sorbose	0	-	22	40,0	33	60,0	9	75,0	1	8,3	2	16,7
Cellobiose	53	96,4	0	-	2	3,6	10	83,3	2	16,3	0	-
Lactose	25	45,4	19	34,6	11	20,0	7	58,3	3	25,0	2	16,7
Sacarose	17	30,9	0	-	38	69,1	3	25,0	0	-	9	75,0
Rafinose	1	1,8	0	-	54	98,2	1	8,3	0	-	11	91,7
Glicerol (ácido + gás)	54	98,2	1	1,8	0	-	10	83,3	2	16,7	0	-
Eritritol	0	-	0	-	55	100,0	0	-	0	-	12	100,0
Adonitol	55	100,0	0	-	0	-	2	16,7	0	-	10	83,3
Dulcitol	19	34,6	1	1,8	35	63,3	1	8,3	0	-	11	91,7
Inositol	0	-	0	-	35	100,0	0	-	0	-	12	100,0
Manitol	55	100,0	0	-	0	-	12	100,0	0	-	0	-
Sorbitol	55	100,0	0	-	0	-	12	100,0	0	-	0	-
Esculina	0	-	50	90,9	5	9,1	0	-	9	75,0	3	25,0
Salicina	14	25,4	21	38,2	20	36,4	3	25,0	3	25,0	6	50,0
ONPG	55	100,0	0	-	0	-	12	100,0	0	-	0	-
VM	55	100,0	0	-	0	-	12	100,0	0	-	0	-
VP	0	-	0	-	55	100,0	0	-	0	-	12	100,0
Uréia (Stuart)	0	-	0	-	55	100,0	0	-	0	-	12	100,0
Uréia (Christensen)	17	30,9	5	9,1	33	60,0	3	25,0	3	25,0	6	50,0
Cítrato (Simmons)	49	89,9	6	10,1	0	-	11	91,7	0	-	1	8,3
Malonato de sódio	55	100,0	0	-	0	-	0	-	0	-	12	100,0

+ positivo em 24 horas

(+) positivos tardios (após 48 horas)

- negativo

Os resultados dos testes bioquímicos realizados com as 70 amostras restantes estão na Tabela 2.

De acordo com os resultados dos testes de utilização do malonato de sódio, degradação da tirosina, crescimento em presença de cianeto de potássio (KCN) e fermentação do adonitol (Tabela 3), os cultivos foram assim classificados: em *C. diversus* (*L. malonatica*), 55 amostras; em *L. amalonatica*, 12; três como grupo

intermediário, por apresentarem características de uma e outra espécie. Estas amostras não utilizaram o malonato de sódio; degradaram a tirosina; duas cresceram em presença de KCN e, destas, uma fermentou o adonitol. Os dados referentes a estas não foram incluídos na Tabela 3.

A classificação das amostras em biotipos, segundo Richard & col. (18), está na Tabela 4.

Tabela 3 — Testes bioquímicos de maior valor diferencial entre as amostras de *Citrobacter diversus* (55) e *Levinea amalonatica* (12)

Testes	<i>C. diversus</i>				<i>L. amalonatica</i>			
	+	%	-	%	+	%	-	%
Malonato	55	100,0	0	0	0	0	12	100,0
Tirosina	54	98,2	1	1,0	1	8,3	11	91,7
KCN	0	0	55	100,0	10	83,3	2	16,7
Adonitol	55	100,0	0	0	2	16,7	10	83,3

Tabela 4 — Classificação das amostras de *Citrobacter diversus*, *Levinea amalonatica* e intermediária segundo os tipos bioquímicos

	Biotipos											
	a		b		c		d		e		f	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
<i>C. diversus</i> (55 amostras)	27	49,1	0	0	11	20,0	9	16,4	8	14,5	0	0
<i>L. amalonatica</i> (12 amostras)	1	8,3	7	58,4	1	8,3	0	0	3	25,0	0	0
Grupo intermed. (3 amostras)	1	33,3	0	0	0	0	0	0	1	33,3	1	33,3
Total (70 amostras)	29	41,5	7	10,0	12	17,1	9	12,9	12	17,1	1	1,4

Discussão

Através do comportamento bioquímico, frente aos testes de citrocromo-oxidase, nitrato e utilização da glicose, as 70 amostras estudadas foram classificadas na família *Enterobacteriaceae*.

Os testes de vermelho de metila (VM), de Voges & Proskauer (VP), 1-aminoácido-oxidase, hidrólise da uréia e crescimento em presença de KCN, permitiram sua localização do grupo (tribo) *Escherichiae*, que inclui, segundo a edição de 1974 do "Bergey's Manual" (3) os gêneros *Escherichia*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella* e *Citrobacter*.

A inclusão destas amostras no gênero *Citrobacter*, de acordo com o "Bergey's Manual", foi possível pelos testes de mobilidade, produção de H₂S, indol, ONPG, fermentação da lactose e do dulcitol, utilização do malonato, liquefação da gelatina e crescimento em presença de KCN.

Os resultados concordaram com os relatados por outros autores, especialmente em relação às amostras identificadas como *C. diversus*, *C. koseri* ou *L. amalonatica*, enquanto que as amostras de *L. amalonatica* revelaram-se mais heterogêneas, bioquimicamente.

Foi observada disparidade de resultados em relação à produção de H₂S. A variação nestes resultados pode ser atribuída ao uso de diferentes meios de cultura, às diferentes peptonas, associadas à maior ou menor riqueza em aminoácidos e ao uso de técnicas mais ou menos sensíveis, o que poderia explicar a discrepância nos resultados obtidos, quando do uso da técnica empregando-se tiras de papel de filtro e a técnica pela leitura da difusão de H₂S em gel de agar.

O relato de amostras com comportamento bioquímico inadequado para identificação nas

espécies propostas, foi feito, anteriormente, por Richard & col. (18). A identificação, como *C. diversus*, destas amostras, poderia ser realizada, desde que a utilização do malonato de sódio deixasse de ser a prova fundamental na separação das espécies de *Levinea*.

Ewing & Davis (7) enfatizaram a importância do uso do teste de fermentação do adonitol, na separação das espécies *C. freundii* e *C. diversus*. Neste trabalho, entretanto, duas das amostras classificadas como *L. amalonatica* fermentaram o adonitol, enquanto duas das classificadas no grupo das intermediárias não fermentaram este álcool. O teste de degradação da tirosina foi positivo, mas três amostras intermediárias, enquanto apenas uma, de *L. amalonatica*, degradou este aminoácido. A utilização de um único destes testes não parece ser suficiente para a definição das duas espécies e a proposta de separá-las através de quatro testes, como mostrado na Tabela 3, poderia ser válida, considerando-se, no entanto, a possibilidade de existência de amostras intermediárias. A este respeito, a resposta poderia ser dada por estudos antigênicos. Os quatro testes apontados mostraram-se adequados para a definição da espécie *C. diversus* (*L. amalonatica*), quando foi observado comportamento mais homogêneo.

Os resultados obtidos, seguindo-se a classificação de biotipos proposta por Richard & col. (18), foram comparáveis aos destes autores e aos de Altmann & col. (2). A maioria das amostras de *C. diversus* foi distribuída entre os biotipos a, c, d, e, enquanto que as de *L. amalonatica* foram classificadas, no biotipo b.

A análise do comportamento bioquímico das amostras classificadas como *C. diversus* revelou que poderiam ser incluídas no gênero *Citrobacter*, segundo Ewing & Davis (7), sob a designação de *C. diversus*, como *C. koseri*, con-

forme Frederiksen (8), ou, ainda, como *C. intermedium*, de acordo com Sedlak (21) e o Bergey's Manual (3). Os resultados encontrados estão de acordo, neste aspecto, com os de Werkman & Gillen (23), Booth & MacDonald (4), Gross & col. (10), Sedlak (20), Aldova & Sourek (1), Madrazo & col. (15, 16) e Altmann & col. (2).

A proposta de classificar este grupo de microrganismos em um gênero independente, como sugerido inicialmente por Macierewicz (14) e depois por Young & col. (21), foi apoiada por Richard & col. (18), Richard (17) e Van Oye (22). Os testes bioquímicos, sugeridos por estes autores, para a separação dos gêneros *Levinea* e *Citrobacter* são: a produção de indol, a fermentação do adonitol, a utilização do malo-

nato de sódio, a descarboxilação da ornitina, a não fermentação da rafinose e não produção de H₂S em meio TSI. Entretanto, amostras atípicas de *C. freundii* podem produzir indol e não produzir H₂S. Amostras de *L. amalonatica* não utilizam o malonato de sódio e a fermentação do adonitol é raramente observada nesta espécie.

Os resultados obtidos estão de acordo com a divisão do gênero *Citrobacter* em três grupos: o primeiro, incluindo a espécie-tipo *C. freundii*; o segundo, formado pela espécie *C. diversus*, e o terceiro, pela espécie *L. amalonatica*, até que seja definida a legitimidade deste nome, já que Macierewicz (14) não propôs nome de espécie, para o gênero *Padlewskia*.

Referências Bibliográficas

1. Aldova, E. & Sourek, J. — First isolations of *Levinea-Citrobacter* cultures in Czechoslovakia. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Orig., 230A:347-360, 1975.
2. Altmann, G.; Sechter, I.; Cahan, D. & Gerichter, C.H. B. — *Citrobacter diversus* isolated from clinical material. J. Clin. Microbiol., 3:390-392, 1976.
3. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th. ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1246 p.
4. Booth, E. V. & McDonald, S. — A new group of Enterobacteria, possibly a new *Citrobacter* sp. J. Med. Microbiol., 4(3):329-336, 1971.
5. Difco Manual. 9th. ed. Detroit, Difco Laboratories, 1972.
6. Edwards, P. R. & Ewing, W. H. — Identification of *Enterobacteriaceae*. 3rd. ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972.
7. Ewing, W. H. & Davis, B. R. — Biochemical characterization of *Citrobacter diversus* (Burkey) Werkman & Gillen and designation of the neotype strain. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon., 22(1):12-18, 1972.
8. Frederiksen, W. — *Citrobacter koseri* (n. sp.) a new species within the genus *Citrobacter*, with a comment on the taxonomic position of *Citrobacter intermedium* (Werkman and Gillen). Publ. Fac. Sci., Univ. J. E. Purkyne, 47:89-94, 1970.
9. Gross, R. J. & Rowe, B. — The serology of *Citrobacter koseri*, *Levinea malonatica* e *Levinea amalonatica*. J. Med. Microbiol., 7(2):155-161, 1974.
10. Gross, R. J.; Rowe, B. & Easton, J. A. — Neonatal meningitis caused by *Citrobacter koseri*. J. Clin. Pathol. 26(2):138-139, 1973.
11. Holt-Harris, J. E. & Teague, O. — A new culture-medium for the isolation of *Bacillus typhosus* from stools. J. Infect. Dis., 18(6):596-600, 1916.
12. Levine, M. — Differentiation of *B. coli* and *B. aerogenes* on a simplified eosin-methylene blue agar. J. Infect. Dis., 23:43-47, 1918.
13. Lund, M. E.; Matsen, J. M. & Blazevic, D. J. — Biochemical and antibiotic susceptibility studies of H₂S-
- negative *Citrobacter*. Appl. Microbiol., 28(1):22-25, 1974.
14. Macierewicz, M. — A proposal of a new group (genus) of *Enterobacteriaceae*. Exptl. Med. Microbiol., 18(4):333-379, 1966.
15. Madrazo, A.; Geiger, J. & Lauter, C.B. — *Citrobacter diversus* at Grace Hospital, Detroit, Michigan. Am. J. Med. Sci., 270(3):497-501, 1975.
16. Madrazo, A.; Henderson, M.D.; Baker, L.; Vaitkevicius, V.K. & Lauter, C.B. — Massive empyema due to *Citrobacter diversus*. Chest, 68(1):104-106, 1975.
17. Richard, C. — A propos de "nouvelles" entérobactéries: *Edwardsiella tarda*, *Levinea malonatica* et *Levinea amalonatica* et *Enterobacter agglomerans*. Bull. Inst. Pasteur (Paris), 73(4):357-381, 1975.
18. Richard, C.; Brisou, B. & Lioult, J. — Étude taxonomique de *Levinea*, nouveau genre de la famille des entérobactéries. Ann. Inst. Pasteur (Paris), 122(6):1137-1146, 1972.
19. Rowe, B.; Gross, R.J. & Allen, H.A. — *Citrobacter koseri*. II — Serological and biochemical examination of *Citrobacter koseri* from clinical specimens. J. Hyg. (Cambridge), 75(1):129-134, 1975.
20. Sedlak, J. — Present knowledge and aspects of *Citrobacter*. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 62:41-59, 1973.
21. Sheth, N.K. & Kurup, V.P. — Evaluation of tyrosine medium for the identification of *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol., 1(5):483-485, 1975.
22. Van Oye, E. — Über eine neue Gruppe der Familie der *Enterobacteriaceae* — die Levinea-Gruppe. Zeitsch. ges. Hyg. Grenzgeb., 21(3):221-222, 1975.
23. Werkman, C.H. & Gillen, G.F. — Bacteria producing trimethylene glycol. J. Bacteriol., 23(2):167-182, 1932.
24. Young, V.M.; Kenton, D.M.; Hobbs & Moody, M.R. — *Levinea*, a new genus of the family *Enterobacteriaceae*. Int. J. Syst. Bacteriol., 21(1): 58-63, 1971.

Efeito do brometo de etídio em amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a drogas

J. P. Siqueira Júnior*
& J. L. Azevedo**

Resumo

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito do brometo de etídio em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas no Brasil (Ribeirão Preto, SP). A partir de amostras resistentes, variantes sensíveis foram obtidos, o que indica herança plasmidial para resistência a penicilina, bicloreto de mercúrio, nitrato de cádmio, estreptomicina, tetraciclina e cloranfenicol. Os determinantes genéticos para resistência a penicilina, mercúrio e clínio, estão ligados, provavelmente em um mesmo plasmídeo. Em determinados variantes sensíveis, a resistência à penicilina e ao cádmio não foi totalmente perdida, o que sugere um efeito mutagênico do brometo de etídio no DNA plasmidial.

Summary

Effects of ethidium bromide in drug resistant strains of Staphylococcus aureus

The present work was carried out aiming the evaluation of the effect of ethidium bromide on strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Brazil (Ribeirão Preto, State of São Paulo). From resistant strains, susceptible variants were obtained, indicating a plasmidial inheritance for resistance to penicillin, mercuric chloride, cadmium nitrate, streptomycin, tetracycline and chloranphenicol. The genetic determinants which confer resistance to penicillin, mercury and cadmium are linked, possibly in the same plasmid. In certain susceptible variants, resistance to penicillin and cadmium was not completely lost suggesting a mutagenic effect of ethidium bromide on the plasmidial DNA.

Introdução

Nos últimos quinze anos, evidências se acumularam de que a resistência a vários antibióticos em *Staphylococcus aureus*, apresenta herança plasmidial. O primeiro caso bem descrito se refere a penicilina, em 1963 (10), embora dados preliminares datem de 1948/49 (2, 18); atualmente, muitos casos de herança extracromossômica são conhecidos, nessa espécie, inclusive em relação à resistência a gentamicina o único antibiótico de importância clínica para o qual ainda não haviam sido descritas amostras resistentes (6, 15).

A instabilidade de determinada característica fenotípica pode ser considerada como primeira indicação de herança plasmidial. Se aumentada, por crescimento em temperaturas elevadas (41/44°C) ou em presença de certas substâncias, como brometo etídio, rifampicina ou do-

decil sulfato de sódio (6), fica reforçada a hipótese de que herança plasmidial esteja de fato envolvida. Nesse particular, resultados mais promissores e constantes foram obtidos em *S. aureus* através do uso do brometo de etídio, não só com relação a plasmídios para resistência a drogas (3, 4, 14), como para plasmídios envolvidos na produção de toxina esfoliativa e bacteriocina (19).

Este trabalho tem o objetivo de avaliar o efeito do brometo de etídio em amostras de *S. aureus* resistentes a drogas.

Material e Métodos

Amostras — Foram utilizadas 35 amostras de *S. aureus* isoladas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (SP, Brasil) além de outras, derivadas destas amostras originais.

* Laboratório de Genética, Departamento de Biologia, Universidade Federal da Paraíba; 58000 João Pessoa, PB, Brasil.

** Instituto e Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo; 13400 Piracicaba, SP, Brasil.

Todas tiveram seus fagotípos determinados pelo Dr. Carlos Solé-Vernin.

Drogas — Além do brometo de etídio (Sigma), as seguintes drogas antibacterianas foram usadas: bicloreto de mercúrio (Merck), cloranfenicol (Parke Davis), estreptomicina (Fontoura Wyeth), nitrato de cádmio (Merck), penicilina (Fontoura Wyeth) e tetraciclina (Pfizer).

Meios de cultura — Foram utilizados o ágar nutritivo (Nutrient Agar, Oxoid), caldo nutritivo (Nutrient Broth, Oxoid) e caldo nutritivo enriquecido (caldo nutritivo com 0,8% de triptona e 1,0% de dextrose).

Testes de sensibilidade as drogas e tratamento pelo brometo de etídio — O método usado foi o da diluição em placas, empregando-se um inoculo de cerca de 10^6 células/ml, sendo a inoculação feita por meio de multiaplicador ou multi-alça (16) para placas contendo ágar nutritivo e placas com ágar nutritivo mais concentrações de 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para cada droga usada. As leituras foram feitas após incubação por 18 a 24 horas a 37°C, considerando-se como concentração inibitória a menor concentração da droga que inibia completamente o crescimento das amostras e, consequentemente, como nível de resistência, a maior concentração usada que permitia amplo desenvolvimento das amostras. Determinados os níveis de resistência, as amostras consideradas resistentes foram submetidas ao tratamento com brometo de etídio. Para tal, amostras eram incubadas a 37°C, com agitação, em caldo nutritivo enriquecido, contendo concentrações sub-inibitórias de brometo de etídio (2,5 a 4,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Após 15 a 24 horas, as amostras foram semeadas em placas com ágar nutritivo em diluições tais que permitissem o crescimento de colônias isoladas, as quais foram replicadas (8) para placas contendo 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bicloreto de mercúrio, tetraciclina ou cloranfenicol e 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de penicilina ou estreptomicina. Colônias que não cresciham nessas placas eram consideradas como tendo perdido a resistência para cada droga usada. As porcentagens de colônias que perderam resistência para cada droga foram então determinadas. Em todos os casos, controles foram efetuados, incubando-se as mesmas amostras no caldo nutritivo enriquecido, porém sem o brometo de etídio. Pelo menos 100 colônias foram ensaiadas, para cada amostra.

Resultados

Testes de sensibilidade — Os níveis de resistência encontrados para as 35 amostras de *S. aureus* ensaiadas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 — Níveis de resistência de 35 amostras de *Staphylococcus aureus*, (μg da droga por ml de meio de cultura)

Amostras				Drogas		
	Hg	PC	SM	TC	CL	
3A1	<1	<1	<1	<1	<1	1
3A11	1	2	2	<1	<1	2
3A21	1	<1	2	<1	<1	5
3A31	1	<1	2	<1	<1	5
3A41	1	<1	1	<1	<1	2
3A2	1	<1	1	<1	<1	1
3A12	10	100	20	50	2	
3A22	1	50	2	<1	<1	2
3A32	1	20	2	<1	<1	2
3A42	2	100	2	<1	<1	2
3A52	1	<1	2	<1	<1	2
3A3	<1	100	1	<1	<1	1
3A13	1	200	50	<1	<1	2
3A23	<1	20	2	<1	<1	2
3A4	<1	<1	2	20	1	
3A14	<1	200	100	<1	<1	2
3A24	2	<1	2	20	2	
3A5	<1	5	50	<1	<1	20
3A35	1	1	2	<1	<1	5
3A45	1	100	50	100	20	
3A6	10	100	<1	<1	<1	2
3A7	10	100	20	<1	<1	2
3A8	10	100	20	<1	<1	2
3A18	20	100	50	<1	<1	2
3A28	10	100	50	<1	<1	2
3A38	10	200	100	<1	<1	2
3A9	10	100	20	20	20	
3A19	<1	<1	2	<1	<1	2
3A29	10	20	50	20	20	
3A10	10	100	1000	20	20	
3A20	20	100	50	<1	<1	5
3A30	20	100	1000	100	50	
3A40	20	100	1000	100	50	
3A50	20	100	50	100	20	
3A60	1	50	50	100	20	

Hg, bicloreto de mercúrio; PC, penicilina; SM, estreptomicina; TC, tetraciclina; CL, cloranfenicol

Para cada droga, as amostras foram divididas em dois grupos, de acordo com o critério utilizado por Trabulsi, Zuliani & Toledo (17) e Souza (16). Assim, 14 amostras resistentes a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ou a concentrações superiores de bicloreto de mercúrio, foram consideradas resistentes à droga. Da mesma forma foram detectadas 23 amostras resistentes a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ou mais de penicilina, 18 para estreptomicina, 11 para tetraciclina e 9 para cloranfenicol.

Tratamento pelo brometo de etídio — As 23 amostras resistentes à penicilina foram submetidas ao tratamento pelo brometo de etídio. Em 20, variantes sensíveis foram obtidos em freqüência que variou de 0,33 a 93,00% das colônias ensaiadas. Em amostras, concomitante, resistentes ao bicloreto de mercúrio e penicilina, houve aparecimento de variantes sensíveis às duas drogas simultaneamente (Tabela 2).

Tabela 2 — Amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina, que produziram variantes sensíveis à penicilina e bicloreto de mercúrio, após tratamento pelo brometo de etídio

Amostra	% de variantes sensíveis*		% de variantes sensíveis*		
	Hg	PC	Amostra	Hg	PC
3A22	— **	1,48	3A7	0,60	0,60
3A32	—	1,00	3A8	2,32	2,32
3A42	—	2,00	3A38	0,33	0,33
3A3	—	1,60	3A9	0,76	0,76
3A13	—	93,60	3A29	4,56	4,56
3A23	—	4,60	3A10	56,80	56,80
3A14	—	0,54	3A20	48,00	48,00
3A45	—	77,30	3A30	20,00	20,00
3A12	38,10	38,10	3A40	2,90	2,90
3A6	22,60	22,60	3A50	13,50	13,50

* Em todos os controles, foi 0,00% a freqüência de variantes sensíveis, com exceção das amostras 3A42 (1,10%) e 3A14 (0,34%).

Hg, bicloreto de mercúrio; PC, penicilina.

** Amostras originalmente sensíveis ao Hg .

Das 18 amostras resistentes à estreptomicina, tratadas com o brometo de etídio, cinco apresentaram variantes sensíveis; das 11 resistentes à tetraciclina, quatro produziram variantes sensíveis; e das nove resistentes ao cloranfenicol, duas produziram variantes sensíveis, após tratamento com o brometo de etídio (Tabela 3).

Tabela 3 — Variantes sensíveis à estreptomicina, tetraciclina e cloranfenicol em amostras de *Staphylococcus aureus*, após tratamento pelo brometo de etídio

Amostra	% de variantes sensíveis*		
	SM	TC	CL
3A14	4,00	—	—
3A24	—	3,17	—
3A5	6,25	—	0,00
3A45	0,41	0,41	1,23
3A29	0,45	0,45	0,90
3A30	4,00	1,33	0,00

* Em todos os controles, foi 0,00% a freqüência de variantes sensíveis, com exceção das amostras 3A14 (1,70%), 3A24 (3,39%) e 3A5 (2,70%).

SM, estreptomicina; TC, tetraciclina; CL, cloranfenicol

Teste de sensibilidade a drogas em variantes sensíveis — Para alguns variantes sensíveis à penicilina, obtidos após tratamento pelo brometo de etídio, determinou-se as concentrações inibitórias de penicilina e nitrato de cádmio. No geral, a perda da resistência à penicilina foi acompanhada da perda da resistência ao nitrato cádmio (Tabela 4). Os fagotipos dos variantes sensíveis foram idênticos aos das amostras originais correspondentes, exceto em alguns casos, onde as mudanças de fagotipos encontradas puderam ser explicadas (C. Solé-Vernin, comunicação pessoal).

Tabela 4 — Concentração inibitória de penicilina e nitrato de cádmio para alguns variantes sensíveis de *Staphylococcus aureus* obtidos após tratamento pelo brometo de etídio

Variantes Sensíveis	Concentração inibitória	
	PC	Cd
3A12BE2	0,05 (200)*	1 (200)
3A22BE1	20,00 (100)	20 (20)
3A42BE1	0,05 (200)	20 (200)
3A13BE1	0,05 (500)	20 (200)
3A45BE10	0,05 (200)	1 (200)
3A6BE1	0,05 (200)	1 (200)
3A8BE1	0,05 (200)	1 (200)
3A29BE1	0,05 (50)	50 (200)
3A20BE1	0,05 (200)	1 (200)
3A30BE1	0,05 (200)	1 (200)
3A40BE1	0,05 (200)	1 (200)
3A50BE1	0,05 (200)	1 (200)

* Entre parênteses, estão as concentrações inibitórias para as amostras originais correspondentes. Com relação ao nitrato de cádmio, amostras crescidas em concentrações superiores a 20 µg/ml foram consideradas resistentes.

PC, penicilina; Cd, nitrato de cádmio

Discussão

Com relação a resistência à penicilina, nossos resultados diferem dos obtidos por Bouanchaud, Scavizzi & Chabbert (3) pelo fato de que os referidos autores não obtiveram variantes sensíveis à penicilina em amostras Hg^RPC^R. Em duas das amostras Hg^RPC^R aqui estudadas, não se obteve variantes sensíveis. Já que resistência ao mercúrio é sempre referida como plasmidial (11, 13), tais resultados devem indicar apenas a ineficiência do brometo de etídio sobre amostras, pelo menos no ensaio realizado. Rubin & Rosemblum (14) obtiveram variantes sensíveis, a partir de amostras resistentes à penicilina, após tratamento pelo brometo de etídio, em freqüência que variou de 0,21 a

58,00%, salientando que a variação deve ser dependente da linhagem estudada, o que também foi comprovado no presente trabalho. Além do mais, a variação também deve depender das condições experimentais utilizadas, razão pela qual seria irrelevante o cotejo dos dados aqui apresentados e os obtidos por outros autores, no que se refere à freqüência de aparecimento de variantes sensíveis. Saliente-se, ainda, que os resultados quantitativos, em alguns casos, são erráticos, em experimentos paralelos com a mesma amostra (J. P. Siqueira Júnior, dados não publicados).

Com relação aos demais antibióticos ensaiados, apesar de variantes sensíveis terem se originado com freqüência relativamente baixa, os dados também indicam existência de herança plasmidial, o que foi também observado, após tratamento com brometo de etídio, por Grubb & O'Reilly (4), em apenas uma amostra, com freqüência também baixa. Na amostra 3A24, e mesmo em outras (Tabela 3), embora o plasmídeo para resistência à tetraciclina fique evidenciado, o papel do brometo de etídio não deve ser conclusivo, já que variantes sensíveis se originaram espontaneamente, praticamente na mesma freqüência. No entanto, a perda espontânea de resistência, em freqüência maior que a taxa de mutação, também é critério para se decidir pela herança plasmidial. Ficou também constatada a existência de um plasmídeo para resistência ao cloranfenicol, após o tratamento pelo brometo de etídio.

É sabido que o plasmídeo responsável pela resistência à penicilina pode conter outros determinantes genéticos (1, 5, 7, 12), inclusive resistência ao cádmio, o que foi evidenciado no presente trabalho. O exame da Tabela 4 revela que, em alguns variantes sensíveis à penicilina e ao cádmio, as resistências não foram perdidas, mas sim alteradas em suas expressões.

Referências Bibliográficas

1. Annear, D. I. & Grubb, W. B. — Linked and unstable resistance to kanamycin and penicillin, and diffusible pigment production in a isolate of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 5:109-111, 1972.
2. Barber, M. — The incidence of penicillin-sensitive variant colonies in penicillinase-producing strains of *Staphylococcus pyogenes*. *J. Gen. Microbiol.*, 3:274-281, 1949.
3. Bouanchaud, D. M.; Scavizzi, M. R. & Chabbert, Y. A. — Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in enterobacteria and staphylococci. *J. Gen. Microbiol.*, 54:417-425, 1969.
4. Grubb, W. B. & O'Reilly, R. J. — Joint transduction of separate extra-chromosomal drug resistance determinants in *Staphylococcus aureus* E169. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 42:377-383, 1971.
5. Johnston, L. H. & Dyke, K. G. H. — Ethidium bromide resistance, a new marker on the staphylococcal penicillinase plasmid. *J. Bacteriol.*, 100:1413-1414, 1969.
6. Lacey, R. W. — Antibiotic resistance plasmids of *S. aureus* and their clinical importance. *Bacteriol. Rev.*, 39:1-32, 1975.
7. Lacey, R. W. & Grinsted, J. — Linkage of fusidic acid resistance to the penicillinase plasmid in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, 73:501-508, 1972.
8. Lederberg, J. & Lederberg, E. M. — Replic plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.*, 63: 399-406, 1952.
9. Mahler, H. R. & Bastos, R. N. — Coupling between mitochondrial mutation and energy transduction. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 71:2241-2245, 1974.
10. Novick, R. P. — Analyses by transduction of mutations

(3A22BE1, 3A42BE1, 3A13BE1 e 3A29BE1), podendo-se sugerir um efeito mutagênico do brometo de etídio no DNA plasmidial. Tal suposição é realmente, provocativa, mercê de evidências da atividade mutagênica do brometo de etídio, no fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* (L.M.M. Bordignon, comunicação pessoal) e na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (9); neste último caso, o brometo de etídio também atua como mutagênico sobre DNA extracromossômico, o DNA mitocondrial. Em *S. aureus*, experimentos envolvendo transdução serão de grande valia para verificação do possível efeito mutagênico do brometo de etídio no DNA plasmidial.

Os dados relatados revelaram que o brometo de etídio fornece realmente indicação da localização plasmidial de certas marcas genéticas e que, na ausência de condições para metodologias mais sofisticadas, pode ser usado sistematicamente para tal, embora o seu papel como "agente de cura" muitas vezes possa ser questionado.

Agradecimentos

Somos gratos ao Dr. Carlos Solé-Vernin, Professor Titular do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP e a toda sua equipe, pela fagotipagem das amostras. Nossos agradecimentos também a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida, durante a realização deste trabalho, a um de seus autores (J.P.S.Jr.) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do Programa Integrado de Genética (PIG).

- affecting penicillinase formation in *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol., 33:121-136, 1963.
11. Novick, R. P. & Roth, C. — Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 95:1335-1342, 1968.
12. Richmond, M. H. — The plasmids of *Staphylococcus aureus* and their relation to other extrachromosomal elements in bacteria. Adv. Microbial Physiol., 2:43-88, 1968.
13. Richmond, M. D. & John, M. — Co-transduction by a staphylococcal phage of the genes responsible for penicillinase synthesis and resistance to mercury salts. Nature, 202:1360-1361, 1964.
14. Rubin, S. J. & Rosenblum, E. D. — Effects of ethidium bromide on growth and on loss of penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 108:1200-1204, 1971.
15. Soussy, C. J.; Bouanchaud, D. H.; Fouace, J.; Du- blanchet, A. & Duval, J. — A gentamycin resistance plasmid in *Staphylococcus aureus*. Ann. Inst. Pasteur (Paris), 126B:91-94, 1975.
16. Souza, E.C. — Resistência a drogas e propriedade colicinogênica em *Escherichia coli*. Univ. Federal Minas Gerais, Belo Horizonte, 76 p., 1975. (Tese de Mestrado).
17. Trabulsi, L. R.; Zuliani, M. E. & Toledo, M. R. F. — Resistance to nine drugs of *Shigella* strains isolated in São Paulo between 1963 and 1968. Rev. Microbiol., 1:71-77, 1970.
18. Voureka, A. — Sensitisation of penicillin-resistant bacteria. Lancet, i:62-65, 1948.
19. Warren, R.; Rogolsky, M.; Willey, B. B. & Glasgow, L. A. — Effect of ethidium bromide on elimination of exfoliative toxin and bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 118:980-985, 1974.

Infeções hospitalares causadas por *Staphylococcus aureus* e seus respectivos fagotipos

C. P. Mendonça*
& C. Solé-Vernin**

Resumo

Investigou-se, em diferentes épocas, em Araraquara, São Paulo, os processos infecciosos adquiridos em hospital, com o principal objetivo de isolar amostras de *Staphylococcus aureus* e verificar os fagotipos predominantes. No isolamento e identificação do *S. aureus*, obedeceu-se à metodologia bacteriológica padrão e a fagotipagem foi realizada pela técnica de Blair & Williams. Utilizou-se os fagos do Conjunto Básico Internacional (29, 52, 52A, 80, 81, 3A, 3C, 55, 71, 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 79, 83A, 85, 42D, e 187) e os fagos experimentais (86, 89, 90, 92, 94, 95, 96), segundo as normas vigentes até setembro de 1974. Em 1970-1971, predominaram nos processos infecciosos adquiridos no hospital, amostras de *S. aureus* lisadas pelo fagos experimentais, em especial o fago 95; em 1974, apareceram, em maior número, os fagotipos lisados pelos fagos do grupo III; e, em 1975, o número de amostras não tipáveis atingiu 46,2%. Nas três etapas da observação, o maior número de processos infecciosos, adquiridos no hospital, causados por *S. aureus*, incidiu em incisões cirúrgicas.

Summary

Hospital infections caused by Staphylococcus aureus and their respective phage types

Hospital-acquired infections were studied at different times in Araraquara, Brazil, with the main purpose of isolating *Staphylococcus aureus* for detecting their most common phage types. For recovering and identifying *S. aureus*, standart bacteriological methods were performed, and in phagotyping the technique given by Blair & Williams was carried out. In addition to the phages of the Basic International Set (29, 52, 52A, 79, 80, 81, 3A, 3C, 55, 71, 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 85, 42D and 187), the experimental phages 86, 89, 90, 92, 94, 95, 96 were also used, according to the rules valid until September 1974. In the nosocomial infections studied in 1970-1971 the *S. aureus* lysed by the experimental phages, particularly the phage 95, were predominant. In 1974, however, the phage types belonging to group III were most common, and in 1975 the number of untypable strain reached 46,2%. In the three observation stages the majority of infection processes, acquired in hospital, occurred in surgical incisions.

Introdução

Numerosas investigações atestam que *Staphylococcus aureus* é uma bactéria facilmente disseminável, produzindo grande número de portadores. Em hospitais, têm sido isoladas freqüentemente do meio ambiente, porém, Ayliffe & col. (2) demonstraram que a importância daquele germe, como contaminante, é reduzida. No entanto, outros autores e, entre eles, Blair & Williams (7), Pequignot & col. (21), Vogelsang (27), Williams & col. (29) afir-

mam que o pessoal hospitalar pode facilmente carrear essas bactérias, de um ambiente para outro, através de mãos e fossas nasais contaminadas.

Apesar da mudança de etiologia das infecções hospitalares e de não mais se verificarem grandes surtos epidêmicos, mas casos endêmicos (12, 20), observa-se, pela literatura, que ainda há preocupação constante com os estafilococos. Isso se justifica, porquanto as amostras que permaneceram parecem ser dotadas de maior periculosidade.

* Departamento de Ciências Bio-Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, 14.800 Araraquara SP.

** Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de S. Paulo, 14.100 Ribeirão Preto, SP.

Não se pode, porém, esquecer que, às vezes, é bem difícil distinguir amostras "perigosas" de amostras não ou menos "perigosas", porque aquelas consideradas, as vezes, benignas, podem, inclusive, causar óbito, dependendo de fatos próprios do paciente (24). Já em 1958, Keefer (14) afirmava que a solução do problema estafilococos hospitalares não mais se encontrava na procura de novos antibióticos, mas no conhecimento dos aspectos bacteriológicos, patogênicos e epidemiológicos da bactéria. Realmente, conhecendo-se melhor o germe, há maior possibilidade de se elaborarem medidas de controle.

De 1940 a 1965, o estafilococo constituiu o maior problema para os hospitais e foi nessa época que a fagotipagem começou a se desenvolver com Fisk (9, 10), até aperfeiçoar-se científicamente com Blair & Williams (7).

Em 1955, Routree & Freeman (23) identificaram amostras com características epidemiológicas lisadas pelo fago 80 e, posteriormente, amostras disseminadas lisadas pelos fagos 80/81. Surgiram depois amostras lisadas pelo padrão bacteriofágico 52/52A/80/81 que, durante longo tempo, foi o mais comumente isolado de infecções hospitalares endêmicas e epidêmicas. Foram aparecendo infecções de interesse a todas as especialidades médicas, causadas por estafilococos com reações a diversos fagos (29).

O fagogrupo III passou a prevalecer, aparecendo outros lisados pelo fago 6.557, relacionando com fagos 84 e 85 e fago 83A (4, 13). Apareceram, posteriormente, amostras não tipadas pelos fagos do conjunto básico e, hoje, já se utilizam vários fagos experimentais.

Em 1964, Mendonça (17) iniciou a observação da freqüência de estafilococos em hospital geral de Araraquara, com levantamento entre o pessoal hospitalar (corpo clínico, enfermagem, atendentes, administração), encontrando-se 22,3% de portadores. Em 1966, surgiram vários processos infecciosos pós-cirúrgicos e verificou-se que outros pacientes adquiriam infecções durante sua estada no hospital.

Em 1970, várias crianças do berçário, destinado aos nascituros a termo, de baixo peso, apresentavam afecção dermatológica e manifestação diarréico-disentérica. Isso coincidia com uma série de casos de processos infecciosos pós-cirúrgicos, no restante do hospital (18).

Neste trabalho, procurou-se estabelecer os padrões de fagotipos predominantes e correlacionar com os variados tipos de estafilococias encontradas.

Material e Métodos

Coleta — Usou-se, como campo de coleta de material, o hospital geral da cidade de Araraquara, SP, a Santa Casa de Misericórdia e Hospital Santa Isabel (considerado como o de maior recurso). Coleto-se material de casos de infecções adquiridas durante a permanência do paciente no hospital, tais como de supuração de incisão cirúrgica, casos de diarréia-disenteria, afecção dermatológica, problemas pulmonares, infecções urinárias, etc. O material de processos infecciosos de incisão cirúrgica ou traumática, vaginal, de diarréia, e outros, foi coletado através de zaragatoa umedecida em caldo nutritivo.

Os estafilococos isolados de material obtido de portadores de diarréia só foram considerados como agente causal do processo quando os exames diretos, corados pelo método de Gram, revelaram a presença de numerosos cocos Gram positivos isolados ou agrupados e o desenvolvimento cultural fora bastante rico, apresentando numerosas colônias (16).

A coleta se estendeu de fevereiro de 1970 a fevereiro de 1971, de janeiro a novembro de 1974 e de janeiro a maio de 1975.

Semeadura e identificação — Para o isolamento dos estafilococos, usou-se o meio Manitol Salt Agar (B.B.L.); e para a identificação e diferenciação, realizaram-se as provas da catalase, oxidação e fermentação da glicose (3). A pureza das culturas foi verificada através de microscopia de esfregaços corados pelo método de Gram. As culturas contaminadas por bactérias Gram negativas, principalmente de *Proteus*, foram submetidas ao tratamento pelo éter etílico, recomendado por Blair (6) e Solé-Vernin & Uthida Tanaka (24).

Isolado o estafilococo, realizou-se a prova da coagulase em tubo com sangue oxalatado de coelho normal (5, 6), com leituras de 1, 2, 4, 18 e 24 horas a 37°C, com a finalidade de diferenciar as espécies.

As amostras de *S. aureus* foram expostas a um conjunto de fagos denominado de Conjunto Básico Internacional e aos fagos experimentais, recomendados pelo Sub Committee on Phage Typing of *Staphylococcus aureus*.

Faziam parte do Conjunto Básico International os fagos 29, 52, 52A, 79, 80, 3A, 3C, 55, 71, 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85, 42D, 81, 187, divididos em cinco fagotipos:

- I — fagos 29, 52, 52A, 79, 80
- II — fagos 3A, 3C, 55, 71

III — fagos 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85

IV — fago 42D

M* — fagos 187, 81

Os fagos experimentais usados foram: 86, 89, 90, 94, 95, 96. Utilizaram-se os fagos na RTD (Routine Test Dilution), definida como a diluição do fago que produz lise semi confluente na sua amostra propagadora. Quando a amostra não foi lisada por qualquer um dos fagos a 1 × RTD, ela foi submetida ao mesmo fago, numa concentração 100 × RTD (ASHESHOV**).

Apesar das alterações apresentadas em setembro de 1974, durante o 6º Encontro do Subcommittee of Phage Typing of *Staphylococcus aureus*, reunido em Brno, Tchecoslováquia**, seguiu-se as normas até então vigentes, com a finalidade de comprovar estudos realizados em épocas diferentes.

Resultados

Para melhor apreciação das alterações havidas, os resultados serão apresentados de acordo com as etapas de observação.

No decorrer da primeira etapa (1970 e 1971), havia predominância de processos infecciosos causados por *S. aureus*. O mesmo não ocorreu nas observações de 1974 e 1975, quando predominaram, consideravelmente, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*, inclusive aparecendo numerosos casos de infecções múltiplas.

Estafilococos de processos infecciosos adquiridos no hospital em 1970-1971

Dentre as 326 amostras de *S. aureus*, obtidas em 1970-1971 no hospital em estudo, que foram analisadas sob diferentes aspectos, e que farão parte de um outro trabalho, destacam-se 133 amostras comprovadamente de infecções adquiridas no hospital.

Fagotipagem — Na Tabela 1, encontram-se os grupos de fagos e os fagotipos isolados daque-las amostras.

Deixou-se de registrar uma amostra, lisada pelo fagogrupo IV (42D) e 2 pelo Miscelânea (187).

Tabela 1 — Fagotipagem das amostras coletadas em 1970-1971

Grupo	Fagotipo	nº	%
I + M. 81	29 81 52/52A/80/81 29/52A/79	8 1 8 1	6,2 0,8 6,2 0,8
Total		18	13,9
II	3A 3C 71 3A/3C 3C/55 3C/55/71 3A/3C/55/71	2 4 1 1 2 1 1	1,5 3,1 0,8 0,8 1,5 0,8 0,8
Total		12	9,4
III	6/47/53/54/75/77/84/85 6/47/53/83A/84 53/83A/85 53/77/83A/84/85 83A 85 77/84 83A/84 77/85 84/85 84 83A/84/85 6/77/83A/84 53/54/77	5 1 3 3 5 1 3 2 1 1 2 1 1 1 1 1 30	3,8 0,8 2,3 2,3 3,8 0,8 2,3 1,5 0,8 0,8 1,5 0,8 0,8 0,8 23,0
I-III	29/52A/79/80/81/6/42E/47/53/54/75/77 29/52A/79/80/81/6/42E/53 29/77/79/84 29/52A/79 29/47/53 54/80/81 29/53	1 1 1 1 1 1	0,8 0,8 0,8 0,8 0,8 0,8
Total		7	5,6
Experimental	95 94/96 86 94 86/89/90 90 96	30 5 1 1 1 1 1 40	23,0 3,8 0,8 0,8 0,8 0,8 0,8 30,8
NT		14	10,8
Total		121	93,1
P		9	6,9

M — Miscelânea

NT — Não tipável

P — Perdidas

* miscelânea

** comunicação pessoal

Tabela 2 — Fagogrupo e condições clínicas das infecções intra-hospitalares no período de 1970-1971

Condição Clínica	incisão cirúrgica	intestinal	respiratória	furúnculo	fleimão	piodermitite	várias	total
Fagogrupo								
I + M. 81	6	1	0	2	3	1	5	18
II	2	3	2	0	2	1	2	12
III	9	6	2	3	0	4	6	30
I-III	5	0	1	1	0	0	0	7
IV	1	0	0	0	0	0	0	1
187	1	1	1	1	0	0	0	2
Experimental	10	13	3	1	3	3	7	40
NT	3	4	0	1	4	0	2	14
P	3	4	0	1	1	0	0	9
Total	40	32	8	9	13	9	22	133

M — Miscelânea

NT — Não tipável

P — Perdidas

Fagogrupo e condições clínicas — Na Tabela 2, registrou-se os fagogrupo e as condições clínicas das infecções intra-hospitalares.

Entre as localizações várias, encontram-se casos de infecções urinárias, infecções em queimaduras, ectimas, meningites, fistulas abdominais, otites médias, infecções ósseas pós-cirúrgicas, infecções traumáticas e septicemia.

Houve predominância de fagos pertencentes ao grupo experimental, com especial referência ao fago 95, que lisou 23,1% do total das amostras.

Estafilococos de processos infecciosos adquiridos no hospital em 1974

Fagotipagem — Obteve-se, neste período, 58 processos infecciosos intra-hospitalares, causados por *S. aureus*, cujos fagogrupo e respectivos fagotipos encontram-se na Tabela 3.

Fagogrupo e condições clínicas — Os resultados da distribuição dos estafilococos, segundo seus fagogrupo e as condições clínicas das infecções, encontram-se na Tabela 4.

Houve predominância do fagogrupo III com o fagotipo 83A, que aparece 17 (29,3%) vezes, só ou associado às reações com outros fagos do grupo.

Entre as infecções várias, houve casos de infecções ginecológicas, fleimão, infecção gástrica provocada por sonda, mastite, infecções em queimados, ectimas, infecção pós-traqueotomia.

Tabela 3 — Fagotipagem das amostras coletadas em 1974

Grupo	Fagotipo	n.º	%
I + M. 81	81	1	1,7
	29/52	1	1,7
Total		2	3,4
II	3C/55/71	1	1,7
	3C/55	4	6,9
Total		5	8,6
III	83A	11	19,0
	42E	6	10,4
	84	1	1,7
	47/53/54/75/77/83A/84/85	4	6,9
	6/42E/47/54/75/77/83A/84	1	1,7
Total		23	39,7
I-III	29/42E	1	1,7
Total		1	1,7
Experimental	89/90/92	3	5,2
	90/92	1	1,7
	86/89	1	1,7
	89/90	3	5,2
	94/96	1	1,7
	89	2	3,4
	86	2	3,4
	95	1	1,7
Total		14	24,1
NT		13	22,4
Total Geral		58	100,0

M — Miscelânea

NT — Não tipável

Tabela 4 — Fagogrupos e condições clínicas das infecções intra hospitalares no período de 1974

		Condições Clínicas						
		Clínica	incisão	urinária	respiratória	intestinal	várias	total
		Fagogrupos						
I + M.	81	2	0	0	0	0	2	
II		1	1	0	1	2	5	
III		12	5	2	1	3	23	
I-III		0	1	0	0	0	1	
Experimental		8	1	0	0	5	14	
NT		12	0	0	0	1	13	
Total		35	8	2	2	11	58	

M — Miscelânea

NT — Não tipável

Tabela 5 — Fagotipagem das amostras coletadas em 1975

Fagogrupo	Fagotipos	n.º	%
I + M. 81	52/52A/80/81	1	2,6
	81	4	10,2
Total		5	12,8
	3A	3	7,7
II	3C	2	5,1
Total		5	12,8
	77/83A/84	2	5,1
III	53/77	1	2,6
	42E	1	2,6
Total		4	10,2
IV	42D	4	10,2
Total		4	10,2
	94/96	1	2,6
Experimental	92	1	2,6
	95	1	2,6
Total		3	7,7
NT		18	46,2
Total Geral		39	100,0

M — Miscelânea

NT — Não tipável

Estafilococos de processos infecciosos adquiridos no hospital em 1975

Observou-se, nesse período, diminuição acentuada da presença do *S. aureus*, passando a etiologia das infecções adquiridas no hospital, praticamente, para as bactérias Gram negativas.

Fagotipagem — Na Tabela 5, encontram-se os fagogrupos e seus respectivos fagotipos isolados das amostras coletadas em 1975.

Entre 39 amostras, 18 (46,2%) não responderam à fagotipagem, número esse bem acima do recomendado pelo Laboratório Internacional de Fagotipagem.

Fagogrupos e condições clínicas — Os resultados da distribuição dos estafilococos, segundo seus fagogrupos e as condições clínicas das infecções, encontram-se na Tabela 6.

Entre as infecções várias, encontram-se infecção do olho, otite média, fleimão, infecção urinária, etc.

Tabela 6 — Fagogrupos e condições clínicas das infecções hospitalares no período de 1975

		Condições Clínicas	incisão	respiratória	queimadura	piodermitite	escara infect.	várias	total
		Fagogrupos							
I + M.	81	0	0	0	0	0	1	4	5
II		2	0	1	1	1	1	0	5
III		2	0	0	1	1	0	1	4
IV		1	0	0	1	1	0	2	4
Experimental		2	0	0	0	0	0	1	3
NT		7	5	2	0	0	1	3	18
Total		14	5	3	3	3	3	11	39

M — Miscelânea

NT — Não tipável

Entre as infecções respiratórias, houve casos graves de broncopneumonias, cujas amostras não foram lisadas pelos fagos utilizados.

A maior incidência de processos infecciosos foi em incisão cirúrgica. Neste caso, houve maior número de amostras não tipáveis.

Discussão

O número de amostras de *S. aureus*, obtido no período de 1974 a 1975, foi bem menor do que o conseguido no período 1970-1971, quando foram observados 133 casos de infecções intra-hospitalares, tendo sido possível, inclusive, caracterizar surtos epidêmicos (18).

Observação semelhante fora feita por Tavares de Mello (26), ao comparar seus resultados com os de Solé-Vernin & Uthida Tanaka (24), no mesmo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Idêntica situação foi sentida no Hospital das Clínicas de São Paulo (11, 15).

Examinando-se a Tabela 1, verifica-se que foram encontrados 40 padrões bacteriófágicos, distribuídos entre os fagos do Conjunto Básico e os experimentais. Na realidade, constituem um número bem menor de amostras semelhantes, pois, segundo Blair & Williams (7), podemos considerar semelhantes, embora, às vezes, se diferenciem por uma, duas ou três reações fagotípicas.

Encontrou-se 18 amostras lisadas pelos fagos do grupo I com predominância do padrão bacteriófágico 52/52A/80/81 e do fagotipo 29, causando processos infecciosos de pouca gravidade. O padrão bacteriófágico 52/52A/80/81, predominou até 1965. Entre as amostras coletadas em 1966, Solé-Vernin & col. (25) encontraram 44% de amostras deste padrão.

O fagogrupo II causa uma variedade de processos infecciosos, mas ele é freqüentemente encontrado em lesões de pele (1, 28). Em nossas amostras, o fagogrupo II apareceu em porcentagem reduzida (9,2%) e dentre as 12 amostras, apenas uma causou piodermite. Foi agente causal de vários tipos de infecções, inclusive de processo broncopneumônico de evolução grave.

O fagogrupo III foi encontrado em 30 processos infecciosos, todos multirresistentes aos antibióticos, confirmado-se o enunciado de Williams (30, 31), os "fagotipos 83A/75/77, com resistência múltipla aos antibióticos, principalmente à meticilina e resistência ao íon mercúrico, podem sobreviver facilmente em

hospitais e são geralmente associados às propriedades epidêmicas de alta virulência".

Entre amostras de 1970-1971, destacam-se fagotipos experimentais, especialmente o 95, causando 40 processos infecciosos, sendo alta a incidência em incisão cirúrgica e infecção intestinal, algumas bem graves. Essas amostras revelaram-se altamente resistentes aos antibióticos, em especial, à meticilina.

Se, na observação de 1970-1971, os fagos experimentais lisaram 30,7% de amostras, compensando as deficiências apresentadas pelos fagos do Conjunto Básico Internacional, o mesmo não ocorreu entre as amostras isoladas em 1974 e 1975.

Reconhece-se que o problema não é apenas nosso, porquanto o Laboratório Internacional de Fagotipagem de *Staphylococcus* (Londres) continua remetendo fagos experimentais aos Laboratórios a ele adidos, devido as respostas não tipáveis, encontradas em várias partes do mundo. Pela revisão da literatura, verifica-se que o número de amostras não tipáveis pelos fagos do Conjunto Básico Internacional tende a aumentar e que os fagos experimentais podem colaborar na obtenção de número maior de amostras lisadas.

Das 58 amostras de *S. aureus*, isoladas em 1974 (Tabela 3), 46,6% não foram lisadas pelos fagos do Conjunto Básico (vigente até setembro de 1974), porém 24,1% foram lisotipadas pelos fagos experimentais 86, 89, 90, 94, 95, 96.

Já, entre as amostras coletadas em 1975 (Tabela 5), 53,9% não foram lisadas pelos fagos do Conjunto Básico (vigente até setembro de 1974) e apenas 7,7% foram lisotipadas pelos fagos experimentais por nós usados. Nesta amostragem, verifica-se que os resultados de amostras não lisadas atinge a 46,2%, discordando do referendado pelo "Laboratório Internacional de Fagotipagem do *Staphylococcus*", que admite uma margem de até 20% de amostras não tipáveis.

O fagogrupo III lisa 37,9% de amostras de estafilococos coletados em 1974, sendo que o fagotipo 83A aparece em 27,6% de amostras só ou associado às reações com outros fagos do mesmo grupo. O nosso achado, neste plano de estudo, está de acordo com Jessen & col. (13), Parker & Hewitt (19), Rountree & Beard (22) e outros que afirmam que os estafilococos hospitalares são lisados mais freqüentemente pelo fagogrupo III quando meticilino-resistentes. Entre as 23 amostras lisadas pelo fagogrupo III, 91,3% são meticilino-resistentes.

Verificou-se que os resultados alcançados em 1975 diferem dos obtidos com as demais amostragens. Bulow (8), apresentou alguma evidenciação da disseminação de fagos bloquedores entre cepas 83A e outras raças a elas relacionadas, pertencentes ao fagogrupo III. Isto seria uma explicação para a alteração verificada, pois sabemos que a mudança do fagotipo provoca outras alterações.

Agradecimentos

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

Referências Bibliográficas

- Albert, S.M. & col. — Bullous impetigo due to group II — *Staphylococcus aureus*, an epidemic in a normal new born nursery. Am. J. Dis. Child., 120:10-13, 1970.
- Ayliffe, G.A.J.; Collins, B.J. & Lowbury, E.J.L. — Ward floors and other surfaces as reservoirs of Hospital infection. J. Hyg., 65:515-536, 1967.
- Baird-Parker, A.C. — Methods for classifying Staphylococci and Micrococci. In Gibbs, B.N. & Skinner, F. A. — Identification methods for microbiologists. London, Academic Press, 59-64, 1966.
- Barret, F.F.; Casey, J.I. & Finland, M. — Infections and antibiotic use among patients at Boston City Hospital (February, 1967). New Engl. J. Med., 278:5-9, 1968.
- Bayliss, B.G. & Hall, E.R. — Plasma coagulation by organisms other than *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 89:101-105, 1965.
- Blair, J.E. — Laboratory diagnosis of staphylococcal infection. Bull. Wld. Hlth. Org., 18:291-307, 1958.
- Blair, J.E. & Williams, R.E.O. — Phage typing of *Staphylococcus aureus*. Bull. Wld. Hlth. Org., 24:771-784, 1961.
- Bulow, P. — Staphylococci in Danish hospitals during the last decade — factors influencing some properties of predominant epidemic strains. Ann. N.Y. Acad. Sci., 182:21-39, 1971.
- Fisk, R.T. — Studies on Staphylococci. I — Occurrence of bacteriophage carriers among strains of *Staphylococcus aureus*. — J. Infect. Dis., 71:153-160, 1942.
- Fisk, R.T. — Studies on Staphylococci. II — Identification of *Staphylococcus aureus* strain by means of bacteriophage. J. infect. Dis., 71:161-165, 1942.
- Hutzler, R.V. — *Staphylococcus aureus* e bactérias Gram negativas em pacientes hospitalizados. São Paulo, Faculdade de Medicina U.S.P., 1971, 154 p. (Tese de Doutoramento)
- Hutzler, R.V. & col. — Incidência de infecções hospitalares. Rev. Hosp. Clin., Fac. Med. S. Paulo (São Paulo), 28: (supl.) 1-7, 1973.
- Jessen, O. & col. — Changing Staphylococci and staphylococcal infections: a ten-year study of bacteria and cases of bacteremia. New. Engl. J. Med., 281:627-635, 1969.
- Keefer, C.S. — The impact of antibiotics on American Medicine. Antibiotics, New York, p. 32-37, 1958-1969.
- Marchesotti, E. & col. — Colonização bacteriana da pele adjacente e infecção da incisão cirúrgica. Rev. Hosp. Clin., Fac. Med. S. Paulo, São Paulo, 28(supl.): 31-41, 1973.
- Mathias, J.R.; Shooter, R.A. & Williams, R.E.O. — *Staphylococcus aureus* in the faeces of Hospital patients. Lancet, 6980:1172-1173, 1957.
- Mendonça, C.P. — Contribuição ao estudo sobre prevalência de *Micrococcus pyogenes* e sua resistência aos antibióticos. Araraquara, Faculdade de Farmácia e Odontologia, 1964, 65 p. (Tese de Doutoramento).
- Mendonça, C.P. — Estudos sobre *Staphylococcus aureus* (portadores e infecções hospitalares) num Hospital Geral de Araraquara, S.P. 1964-1975. Araraquara, Faculdade de Farmácia e Odontologia. UNESP, 1976, 208 p. (Tese de Docência Livre).
- Parker, M.T. & Hewitt, J.H. — Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Lancet 1:800-804, 1970.
- Parker, M.T. & col. — Endemic staphylococcal infections in Hospitals. Ann. N.Y. Acad. Sci., 236:466-484, 1974.
- Péquignot, H. & col. — La pathologie infectieuse dans un service de médecine générale. Sem. Hôsp. (Paris) 44:2587-2599, 1968.
- Rountree, P.M. & Beard, M.A. — Hospital strains of *Staphylococcus aureus* with particular reference to methicillin resistant strains. Med. J. Aust. (Sidney), 2:1163, 1968.
- Rountree, P.M. & Freeman, B.M. — Infections caused by a particular phage type *Staphylococcus aureus*. Med. J. Aust., (Sidney), 2:157-161, 1955.
- Solé-Vernin, C. & Uthida Tanaka, A.M. — A prova de Moore conjugada ao antibiogramma na identificação das amostras hospitalares e não hospitalares de *Staphylococcus aureus*. Hospital (Rio de Janeiro), 75:2043-2086, 1969.
- Solé-Vernin, C.; Uthida Tanaka, A.M. & Lima Filho, E. C. — A study of hospital acquired staphylococcal diseases by means of phage typing in Ribeirão Preto, SP, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 17:32-37, 1975.
- Tavares de Mello, E. — Contribuição aos estudos das estafilococcos hospitalares, Rib. Preto, SP. 1971-1972. Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina U.S.P., 1972, 47 p. (Tese de Doutoramento).
- Vogelsang, T.M. & Boe, J. — A long term staphylococcal study. Acta. Path. Microbiol. Scand., 54:225, 1962.
- Williams, R.E.O. & col. — Isolation for the control of staphylococcal infection in surgical wards. Brit. Med. J. (London), 2:275, 1962.
- Williams, R.E.O & col. — Hospital infection causes and prevention. 2 ed. London, Lloyd and Luke, 1966.
- Williams, R.F. — Hospital staphylococci. Lancet, 1:383-384, 1972.
- Williams, R.F. — Hospital staphylococci. Lancet, 1:589-590, 1972.

Micobactérias atípicas isoladas de material humano na cidade do Rio de Janeiro. II — Identificação bioquímica e espectro de resistência aos tuberculostáticos*

Leila de Souza Fonseca
& Paulo Pinto Gontijo Filho

Resumo

Cento e quarenta e quatro amostras de micobactérias atípicas, isoladas de pacientes supostamente tuberculosos, foram analisadas taxonomicamente, incluindo estudos de espectro de resistência aos tuberculostáticos. Observou-se predominância de microrganismos pertencentes ao grupo II de Runyon (36,1%), seguida dos grupos III (32,7%) e IV (25,7%). As micobactérias fotocromogênicas (grupo I) representaram 5,5% dos isolamentos. Aproximadamente a metade das amostras estudadas (51,9%) comportou-se como micobactérias potencialmente patogênicas para o homem, sendo identificados *Mycobacterium fortuitum* (18%), *Mycobacterium scrofulaceum* (16,6%), *Mycobacterium avium-intracellulare* (11,1%), *Mycobacterium kansasii* (5,5%) e *Mycobacterium tuberculosis* (0,7%). No entanto, a impossibilidade de verificar os critérios de patogenicidade estabelecidos para micobactérias atípicas, impede uma melhor análise do significado desses isolamentos. Entre setenta e três amostras examinadas, cinquenta e três (73%) mostraram resistência aos tuberculostáticos utilizados (SM, INH e PAS), confirmando os dados existentes na literatura.

Summary

Atypical mycobacteria isolated from human sources in Rio de Janeiro. II — Bacteriological study and drug susceptibility test

One hundred forty four strains of atypical mycobacteria isolated by the "Laboratório Central de Tuberculose do Rio de Janeiro", mainly from sputum of patients suspected of having tuberculosis, were analysed by biochemical tests and drug susceptibility testing. The majority of atypical strains were identified as Runyon's group II strains (36,1%). Next in frequency came group III organism (32,7%) and rapid growing mycobacteria (25,7%). Other isolates were photocromogens (5,5%). About half the strains studied appeared to be potential pathogens belonging to the species *Mycobacterium fortuitum* (18,0%), *Mycobacterium scrofulaceum* (16,6%), *Mycobacterium avium-intracellulare* (11,1%), *Mycobacterium kansasii* (5,5%) and *Mycobacterium tuberculosis* (0,7%). Of 73 strains checked for drug resistance 53 (73%) were found to be multiple drug resistant (INH, SM and PAS) which is similar to the as findings of other workers.

Introdução

A primeira tentativa de classificação de micobactérias atípicas foi realizada por Timpe & Runyon (30) e Runyon (26), dividindo-as em quatro grupos, baseando-se na produção de pigmento, na presença e ausência de luz e na velocidade de crescimento. A aplicação de taxonomia numérica, no gênero *Mycobacterium*, permitiu o reconhecimento das espécies *M. tuberculosis* e *M. bovis*, descritas no passado, como também a definição de novas espécies, entre os microrganismos reunidos nos quatro

grupos de Runyon (17, 22, 32). Adicionalmente, a taxonomia numérica possibilitou a seleção de pequeno número de testes com um alto grau de confiança, que podem ser usados pelos laboratórios de diagnóstico para a identificação desses microrganismos (16, 34).

Nesse trabalho foi selecionado um pequeno número de testes, facilmente reproduutíveis e importantes na definição das diversas espécies, especialmente as patogênicas para o homem. Simultaneamente, foi verificado o espectro de resistência aos principais tuberculostáticos testados "in vitro".

* Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia, com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FINEP e CEPG da UFRJ.

Material e Métodos

Amostras utilizadas — Foram as mesmas referidas em trabalho anterior (7).

Classificação nos grupos de Runyon — Foram analisados: tempo de crescimento, produção de pigmento e incorporação de ferro. Cada amostra foi repicada a partir do crescimento em meio líquido de Dubos, para dois tubos de Loewenstein-Jensen, a partir de inóculo de 0,1 ml.

O tempo de crescimento e a produção de pigmento, na ausência e presença de luz, em meio de Loewenstein-Jensen, foram realizados segundo Tison & col. (31).

As amostras que cresceram em mais de cinco dias e não transformaram o citrato férrico amoniacal foram consideradas de crescimento lento.

Identificação de micobactérias de crescimento lento (grupo I, II e III de Runyon) — As amostras de crescimento lento foram repicadas em tubos de Loewenstein-Jensen e incubadas a 37°C. As culturas obtidas foram utilizadas nos testes de niacina, redução de nitrato e atividade catalásica a 68°C.

A cada tubo de Loewenstein-Jensen foram adicionados 2 ml de solução tampão fosfato (M/45, pH 7.0), contendo nitrato de sódio (M/100). Os tubos foram inclinados, para permitir o contato da solução ao crescimento bacteriano e mantidos a 37°C durante 15 minutos. A seguir, foram retiradas duas alíquotas de 0,1 ml para o teste de niacina. Os tubos com o restante da solução foram agitados em "Vortex Jr." e duas alíquotas de 0,5 ml, da suspensão restante, foram tomadas para os testes de atividade catalásica a 68°C e redução de nitrato.

A presença de ácido nicotínico, a atividade catalásica a 68°C e a redução de nitrato foram estudadas pela técnica proposta por Andrade (1).

Adicionalmente, foram realizadas os seguintes testes: atividade catalásica à temperatura ambiente (18), hidrólise do "Tween 80" (33), redução de telurito de potássio em três dias (13) e tolerância à 5% de cloreto de sódio (9).

Identificação das micobactérias de crescimento rápido (grupo IV de Runyon) — Para a identificação das amostras de crescimento rápido, além dos testes de redução de nitrato, hidrólise de "Tween 80" e tolerância a 5% de cloreto de sódio, já descritos anteriormente, foram realiza-

dos os relacionados a seguir: crescimento às temperaturas de 42°C, 45°C e 52°C, em meio de Loewenstein-Jensen, fermentação do inositol, sacarose e manitol (10), crescimento em agar MacConkey (15) e atividade aril-sulfatásica em três dias (27).

Critério de identificação — As amostras foram consideradas como pertencentes a determinada espécie, quando apresentaram apenas um único teste com resultado divergente do esperado.

Teste de sensibilidade aos tuberculostáticos — Foi investigado pelo método das proporções (5), utilizando-se os seguintes tuberculostáticos: INH (isoniazida), PAS (ácido para-amino-salicílico) e SM (estreptomicina).

Resultados

A distribuição das 144 amostras, de acordo com os quatro grupos propostos por Runyon (26), mostrou predominância de microrganismos pertencentes ao grupo II (36,1%), seguidos dos grupos III (32,7%) e IV (25,7%). Oito amostras comportaram-se como micobactérias fotocromogênicas.

Identificação das micobactérias de crescimento lento — A identificação dos microrganismos fotocromogênicos está representada na Tabela 1. Todas as amostras apresentaram comportamento bioquímico de *M. kansasii*, não sendo observada qualquer divergência do comportamento esperado, nos resultados dos testes utilizados.

Entre as micobactérias do grupo II de Runyon, 24 foram identificadas como *M. scrofulaceum*, 21 como *M. flavescent* e 7 como *M. gordona* (Tabela 1). Nenhuma das amostras escotocromogênicas, de crescimento lento, apresentou propriedades comuns às de *M. szulgai*.

As amostras pertencentes ao grupo III foram identificadas como *M. avium-intracellular* (16 amostras), *M. terrae* (10 amostras) e *M. triviale* (2 amostras), excetuando-se duas amostras que divergiram em mais de uma propriedade do comportamento esperado para as espécies desse grupo. Não foi observada a presença de *M. xenopi* (Tabela 1).

Uma das micobactérias não cromogênicas, de crescimento lento, foi identificada como *M. tuberculosis*.

Tabela 1 — Identificação das amostras de crescimento lento do gênero *Mycobacterium* (grupo I, II e III de Runyon)

Espécies ou amostras estudadas	Pigmento no escuro	Pigmento fotoativo	Produção de niacina	Redução de nitrato	Atividade catalásica > 45 mm de espuma à 68°C	Hidrólise do "Tween 80" em 5 dias	Redução de telúrito de potássio em dias	Tolerância à 5% de cloreto de sódio
<i>M. kansasii</i>	+	+	-	+	+	+	+	-
8 amostras	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>M. marinum</i>	-	+	-	-	-	V	+	-
<i>M. simiae</i>	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	+	-	-	-	+	+	-	-
10 amostras	+	-	-	-	+	+	-	-
14 amostras	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. szulgai</i>	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>M. gordonaiae</i>	+	-	-	-	+	+	+	-
4 amostras	+	-	-	-	+	+	+	-
3 amostras	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>M. flavescens</i>	+	-	-	+	+	+	+	-
7 amostras	+	-	-	+	+	+	+	+
1 amostra	+	-	-	+	+	+	-	-
13 amostras	+	-	-	+	-	+	-	±
<i>M. avium-intracellulare</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
16 amostras	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. xenopi</i>	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. tuberculosis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-
1 amostra	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>M. gastri</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
4 amostras	-	-	-	-	-	+	-	-
12 amostras	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. terrae</i>	-	-	-	+	+	+	+	-
4 amostras	-	-	-	+	-	+	-	-
6 amostras	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>M. triviale</i>	-	-	-	+	+	+	+	-
1 amostra	-	-	-	+	+	+	-	+
1 amostra	-	-	-	-	+	+	-	±
Amostras não identificadas:								
2 amostras	-	-	-	-	-	+	+	-

V — variável

Tabela 2 — Identificação das amostras de crescimento rápido de gênero *Mycobacterium* (grupo IV de Runyon)

Espécies ou amostras estudadas	Transformação de citrato férrico amoniacal	Atividade antisulfatásica em 3 dias	Crescimento em agar MacConkey	Pigmento no escuro	Pigmento fotoativo	Crescimento 42°C 45°C 52°C	Fermentação sacarose	Tolerância à 5% de cloreto de sódio	Redução de nitrito do "Tween 80" em 5 dias	Hidrólise
							mannose	inositol		
<i>M. fortuitum</i>	+	+	+	-	-	V*	-	-	+	+
17 amostras	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
4 amostras	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
5 amostras	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
<i>M. chelonei</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. vacae</i>	+	-	-	V*	+	+	-	+	+	+
2 amostras	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
1 amostra	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
1 amostra	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>M. diernhoferi</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
3 amostras	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>M. phlei</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>M. smegmatis</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Amostras não identificadas:										
2 amostras	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
1 amostra	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
1 amostra	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+

V* — variável

Identificação de micobactérias de crescimento rápido — Nesse grupo, *M. fortuitum* foi a espécie mais prevalente, perfazendo o total de vinte e seis amostras. Quatro amostras foram identificadas como *M. vaccae*. As três amostras de *M. diernhoferi* estudadas diferiram do comportamento esperado para essa espécie, apresentando tolerância a 5% de cloreto de sódio (Tabela 2). Quatro amostras não puderam ser caracterizadas, por apresentarem resultados divergentes das espécies de micobactérias de crescimento rápido, em mais de uma propriedade estudada (Tabela 2).

Não foram identificadas amostras pertencentes às espécies *M. phlei*, *M. chelonei* e *M. smegmatis*.

Identificação de micobactérias patogênicas — A distribuição das amostras, nas respectivas espécies, está representada na Tabela 3. A metade (51,9%) do total estudado comportou-se como micobactérias de potencialidade patogênica para o homem. Foram identificadas amostras de *M. fortuitum* (18%), *M. scrofulaceum* (16,6%), *M. avium-intracellulare* (11,1%), *M. kansasii* (5,5%) e *M. tuberculosis* (0,7%).

Sensibilidade aos tuberculostáticos — Aproximadamente 50% das amostras (73/144) foi submetido ao teste direto de sensibilidade às drogas, pelo método das proporções. Os resultados encontrados estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 3 — Distribuição das amostras estudadas de acordo com a espécie

Grupo	Espécie	Nº de amostras	%
I	<i>M. kansasii</i>	8	5,5
	<i>M. marinum</i>	—	—
	<i>M. simiae</i>	—	—
II	<i>M. scrofulaceum</i>	24	16,6
	<i>M. flavescens</i>	21	14,6
	<i>M. gordonaë</i>	7	4,9
	<i>M. szulgai</i>	—	—
III	<i>M. avium-intracellulare</i>	16	11,1
	<i>M. gastri</i>	16	11,1
	<i>M. terrae</i>	10	7,0
	<i>M. triviale</i>	2	1,4
	<i>M. xenopi</i>	—	—
	Não identificadas	2	1,4
IV	<i>M. fortuitum</i>	26	18,0
	<i>M. vaccae</i>	4	2,8
	<i>M. diernhoferi</i>	3	2,1
	<i>M. chelonei</i>	—	—
	<i>M. phlei</i>	—	—
	<i>M. smegmatis</i>	—	—
	Não identificadas	4	2,8
<i>M. tuberculosis</i>		1	0,7
TOTAL		144	100

No grupo I de Runyon, a única amostra testada foi resistente às três drogas (INH, PAS e SM). Entre as micobactérias dos grupos II, III e IV, foi observada menor freqüência de amostras sensíveis ao PAS e à INH, do que à SM. As amostras escotocromogênicas, de crescimento lento (grupo II), mostraram maior sensibilidade a esses tuberculostáticos, do que as classificadas nos grupos III e IV (Tabela 4).

Tabela 4 — Sensibilidade das amostras estudadas aos tuberculostáticos

Grupo de Runyon	Espécie	Número de amostras sensíveis		
		estreptomicina	isoniazida	ácido para-aminosalicílico
I	<i>M. kansasii</i>	0/1	0/1	0/1
II	<i>M. scrofulaceum</i>	4/7	3/7	2/7
	<i>M. gordonaë</i>	3/5	2/5	1/5
	<i>M. flavescens</i>	2/3	1/3	1/3
III	<i>M. terrae</i>	1/8	0/8	0/8
	<i>M. avium-intracellulare</i>	4/11	1/11	1/11
	<i>M. gastri</i>	3/13	0/13	0/13
	<i>M. triviale</i>	0/2	0/2	0/2
IV	<i>M. fortuitum</i>	1/19	0/19	1/19
	<i>M. vaccae</i>	0/2	0/2	0/2
	<i>M. diernhoferi</i>	2/2	1/2	1/2
TOTAL		20/73	8/73	7/73

Amostras sensíveis / total de amostras estudadas

Cinquenta e três amostras (73%) submetidas ao teste de sensibilidade às drogas evidenciaram resistência múltipla. A única amostra de *M. kansasii* ensaiada apresentou esse comportamento, o mesmo ocorrendo com 42,8% (3/7), 63,6% (7/11) e 94,7% (18/19) das amostras de *M. scrofulaceum*, *M. avium-intracellulare* e *M. fortuitum*, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 — Resistência múltipla dos tuberculostáticos testados *In Vitro*

Espécie	Nº de amostras resistentes a			Total de amostras testadas
	1 droga	2 drogas	3 drogas	
<i>M. kansasii</i>	0	0	1	1
<i>M. scrofulaceum</i>	1	1	3	7
<i>M. gordonaee</i>	1	1	2	5
<i>M. flavescens</i>	0	1	1	3
<i>M. terrae</i>	0	1	7	8
<i>M. avium-intracellulare</i>	0	3	7	11
<i>M. gastri</i>	0	3	10	13
<i>M. triviale</i>	0	0	2	2
<i>M. fortuitum</i>	1	0	18	19
<i>M. vaccae</i>	0	0	2	2
<i>M. diernhoferi</i>	0	1	0	2
TOTAL	3	11	53	73

Discussão

A distribuição dos microrganismos nos grupos de Runyon mostrou discreta predominância de micobactérias escotocromogênicas (36,1%) sobre as não cromogênicas, de crescimento lento. Magalhães & col. (20) encontraram situação semelhante em pacientes de um Sanatório de Tuberculose, em Recife. Apesar das infecções pulmonares por micobactérias escotocromogênicas serem raras (4, 25, 36) o isolamento desse grupo em escarros de pacientes tuberculosos é fato comum (26).

A patogenicidade das micobactérias atípicas foi discutida por vários autores (19, 26, 29). Os microrganismos implicados em processos infeciosos são usualmente oportunistas, causando doenças quando há diminuição de resistência local ou geral do paciente (14). No entanto, a maioria dos isolamentos obtidos em laboratório é casual, correspondendo a bactérias comensais ou saprófitas (21).

As micobactérias fotocromogênicas (grupo I de Runyon) incluem três espécies: *M. kansasii*, *M. marinum* e *M. simiae*, todas dotadas de potencialidade patogênica para o homem (28). No

presente trabalho, *M. kansasii* constitui 5,5% das amostras estudadas.

Diversos autores (11, 23, 39), relataram que *M. kansasii* é usualmente inibido "in vitro" em presença de altas concentrações de isoniazida, estreptomicina e ácido para-aminosalicílico. A única amostra testada foi resistente às concentrações usuais desses tuberculostáticos, corroborando os resultados encontrados na literatura.

O grupo II de Runyon apresenta as seguintes espécies: *M. scrofulaceum*, *M. gordonaee*, *M. flavescens* e *M. szulgai*. As espécies *M. scrofulaceum* e *M. szulgai* podem produzir doença no homem (28, 34). Somente uma das 23 amostras identificadas como *M. scrofulaceum* foi proveniente de nódulo linfático, enquanto a maior parte (19 amostras) foi encontrada no esarro e, não apresenta significado clínico.

M. scrofulaceum usualmente apresenta alto grau de resistência aos principais tuberculostáticos (23). No entanto, Boisvert (4) e David (6) encontraram 12% e 64%, respectivamente, de amostras sensíveis à estreptomicina. Entre as sete amostras identificadas nessa espécie, três apresentaram resistência múltipla à estreptomicina, à isoniazida e ao ácido para-aminosalicílico e quatro foram sensíveis à estreptomicina.

As micobactérias não cromogênicas, de crescimento lento, se distribuem nas seguintes espécies: *M. xenopi*, *M. avium-intracellulare*, *M. terrae*, *M. gastri* e *M. triviale*, sendo as espécies patogênicas representadas por *M. avium-intracellulare* e *M. xenopi* (16, 28).

Na coleção examinada, 11,1% das amostras foi identificado como *M. avium-intracellulare*, com comportamento similar ao esperado em todos os testes realizados. A maioria foi isolada a partir do esarro (11/16), sendo, as restantes, quatro provenientes de urina e uma de lavado brônquico.

M. avium-intracellulare geralmente apresenta resistência aos tuberculostáticos usuais (4, 6, 8). Entre as 11 amostras estudadas, sete (63%) foram resistentes simultaneamente à estreptomicina, ácido para-aminosalicílico e à isoniazida e, três (27%) ao ácido para-aminosalicílico e à isoniazida. Quatro (36%) foram sensíveis à estreptomicina, concordando com os dados de David (6), que encontrou sensibilidade a esse quimioterápico em 37% de amostras testadas "in vitro".

As micobactérias de crescimento rápido envolvem as seguintes espécies: *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. vaccae*, *M. diernhoferi*, *M. tham-*

nopheos, *M. fortuitum* e *M. chelonei*. *M. fortuitum* e *M. chelonei* são potencialmente patogênicos (16, 17).

No Rio de Janeiro, Andrade & Santiago (3) relataram a presença de 68,6% de micobactérias de crescimento rápido entre as amostras de micobactérias atípicas, das quais a maioria foi posteriormente identificada como *M. fortuitum* (2). Em Recife, essa espécie constitui apenas

6,2% dos isolamentos realizados (20). No presente trabalho, *M. fortuitum* foi a espécie prevalente com 26 amostras (18%), na sua maioria (76,9%) proveniente do trato respiratório.

M. fortuitum é a espécie de espectro de resistência mais amplo (4, 8, 24). Apenas uma das 19 amostras estudadas mostrou sensibilidade a dois dos tuberculostáticos (SM e PAS) ensaiados.

Referências Bibliográficas

1. Andrade, L. — Identificação bioquímica rápida do bacilo da tuberculose em cultura primária — niacina, catalase à temperatura ambiente, termoinativação da catalase e nitroreduktase. Rev. Ser. Nac. Tuber., 12:125-156, 1968.
2. Andrade, L. — Micobacteriose no Brasil. Apresentado à mesa redonda "Micobacteriose na América Latina" no VI Congresso Latino Americano e 1º Venezolano de Microbiologia em Caracas de 1 a 7/12/1974, 1974.
3. Andrade, L. & Santiago, A.C. — Micobactérias atípicas na Guanabara. Rev. Ser. Nac. Tuber., 15:124-145, 1971.
4. Boisvert, H. — Mycobacteries (*Mycobacterium bovis* et "atypiques") identifiées à l'Institut Pasteur de Paris de 1960 a 1972. Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 53:233-245, 1973.
5. Canetti, G. & Grosset, J. — Techniques et indications des examens bactériologiques en tuberculose. St. Mandé. Éditions de la Tourelle, 1968.
6. David, H. — Indications of drug-susceptibility testing in tuberculosis and other human mycobacterioses. Atlanta, Ga., U.S. Public Health Service Center for Disease Control, 1974.
7. Fonseca, L.S. & Gontijo Filho, P.P. — Micobactérias atípicas isoladas de material humano na cidade do Rio de Janeiro. I — Identificação preliminar pela morfologia colonial. Rev. Microbiol., (S. Paulo), 9(3):125-130, 1978.
8. Gernez-Rieux, C.; Tacquet, A.; Devulder, B. & Debruyne, J. — Les mycobactéries humaines. Méthodes actuelles de diagnostic bactériologique. Aspects cliniques, thérapeutiques et épidémiologiques. Rev. Tuberc. Pneumol., 34:1-70, 1970.
9. Gontijo Fº, P.P. & Santos, M.M. — Avaliação do meio de Loewenstein-Jensen na observação da tolerância de micobactérias ao cloreto de sódio. An. Microbiol., 17:61-64, 1970.
10. Gordon, R.E. & Mihm, J.M. — A comparison of four species of mycobacteria. J. Gen. Microbiol., 21:736-748, 1959.
11. Hedgecock, L.N. — Comparative study of the action of PAS on *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium tuberculosis*. Amer. Rev. Resp. Dis., 91:719-727, 1965.
12. Juhlin, I. — Contribution to the classification of mycobacteria and nocardias. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 70 (Suppl. 189):1-120, 1967.
13. Kilburn, J.O.; Silcox, V.A. & Kubica, G.P. — Differential identification of mycobacteria. V — The tellurite reduction test. Amer. Rev. Resp. Dis., 99:94-100, 1969.
14. Kovacs, N. — New bacteriological and clinical aspects of "anonymous" ("Atypical") mycobacteria. Bull. Int. Union. Tuberc., 37:351-360, 1966.
15. Kubica, G.P. — Laboratory outline. Laboratory methods in the diagnoses of tuberculosis, Atlanta, Ga., U.S. Public Health Service Center for Disease Control, 1963.
16. Kubica, G.P. — Differential identification of mycobacteria, VIII — Key features for identification of clinically significant mycobacteria. Amer. Rev. Resp. Dis., 107: 9-21, 1973.
17. Kubica, G.P.; Baiss, I.; Gordon, R.E.; Jenkins, P.E.; Kwapinskey, B.G.; McDermont, G.; Pattyn, S.R.; Saito, H.; Silcox, V.; Stanprol, J.L.; Takeya, K. & Tsukamura, M. — A co-operative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria. J. Gen. Microbiol., 73: 55-70, 1972.
18. Kubica, G.P.; Jones, W.O.; Abbott, V.D.; Beam, R. D.; Kilburn, J.O. & Cater Jr., J.C. — Differential identification of mycobacteria. I — Tests on catalase activity. Amer. Rev. Resp. Dis., 94:400-405, 1966.
19. Lewis, A.G.; Dunbar, F.P.; Lasche, F.M.; Bond, J. O.; Lerner, F.N.; Wharton, D.J.; Hardy, A.F. & Davies, R. — Chronic pulmonary disease due to atypical mycobacterial infections. Amer. Rev. Resp. Dis., 80: 188-199, 1959.
20. Magalhães, M.; Campos, G. & Guerra, T. — Bacteriological study on atypical mycobacteria associated with man. Rev. Microbiol., 3:85-89, 1972.
21. Marks, J. & Trollope, D.R. — A study of the "anonymous" mycobacteria. III — Problems of classifications and diagnoses, practical recommendations. Tubercl., 41:133-142, 1960.
22. Meissner, G.; Schroder, K.H.; Amadio, G.E.; Anz, W.; Chaparas, S.; Engel, H.W.B.; Jenkins, P.A.; Kappler, W.; Kleeberg, M.H.; Kubala, E.; Kubin, M.; Lauterbach, D.; Lind, A.; Magnusson, M.; Mikova, Z. D.; Pattyn, S.R.; Schaefer, W.B.; Stanford, J.L.; Tsukamura, M.; Wayne, L.G.; Willers, I. & Wolinsky, E. — A co-operative numerical analyses of nonscoto-and-nonphotochromogenic slowly growing mycobacteria. J. Gen. Microbiol., 83:207-235, 1974.
23. Mitchison, D.A. & Selkon, J.B. — Atypical mycobacteria. Bull. Int. Union. Tuberc., 29:358, 1959.
24. Palhano Jr., L. — *Mycobacterium fortuitum*. Aspectos bacteriológicos, bioquímicos, imunológicos e patogenicidade para o homem e animais de laboratório. Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1975. (Tese de Mestrado).
25. Prignot, J. & Simon-Pouthier, F. — Étude cliniques des infections broncho-pulmonaires a mycobactéries atypiques. Rev. Tuberc. Pneumol., 34:37-52, 1970.
26. Runyon, E.H. — Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med. Clin. N. Amer., 43:273-290, 1959.
27. Runyon, E.H. — Identification of acid-fast pathogens utilizing colony characteristics. 2nd ed. Veterans Administration, 1969.
28. Runyon, E.H. — Ten mycobacterial pathogens. Tubercl., 55:235-240, 1974.
29. Tacquet, A.; Tison, F. & Devulder, B. — Quelques aspects actuels des infections broncho-pulmonaires provoquées par les mycobactéries dites "atypiques". Rev. Tuberc. Pneumol., 28:89-116, 1964.
30. Timpe, A. & Runyon, E.H. — The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease. J. Lab. Med., 44:202-209, 1954.

31. Tison, F.; Tacquet, A. & Devulder, B. — Un test simple d'étude des mycobactéries: la transformation du citrate de fer ammonical. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 106:797-801, 1964.
32. Wayne, L.G.; Dietz, T.M.; Gernez-Rieux, C.; Jenkins, P.A.; Kappler, W.; Kubica, G.P.; Kwapinski, J.B.G.; Pattyn, S.R.; Runyon, E.H.; Schroder, K.H.; Silcox, V.A.; Tacquet, A.; Tsukamura, M. & Wolinsky, E. — A co-operative numerical analysis of scotochromogenic slowly mycobacteria. J. Gen. Microbiol., 66:255-271, 1971.
33. Wayne, L.G. & Doubek, J.R. — Diagnostic key to mycobacteria encountered in clinical laboratories. Appl. Microbiol., 16:925-931, 1968.
34. Weg, J.G.; Bates, J.H.; Corpe, R.; Farer, L.S.; Kubica, G.P.; Sbarbaro, J.A. & Sewell, E.M. — Diagnostic standards and classification of tuberculosis and other mycobacterial diseases. American Lung Association, New York, 1974.
35. Wolinsky, E. — Chemotherapy and pathology of experimental photochromogenic mycobacterial infections. Amer. Rev. Resp. Dis., 80:552-534, 1959.
36. Wolinsky, E. — The role of scotochromogenic mycobacteria in human disease. Ann. N. Y. Acad. Sci., 106: 67-71, 1963.

Radiação gama e instabilidade em *Aspergillus niger**

J. C. da Silva**
& J. L. de Azevedo***

Resumo

Uma linhagem de *Aspergillus niger*, usada industrialmente na produção de ácido cítrico, foi submetida a múltiplas irradiações com raios gama e a instabilidade da linhagem após cada irradiação foi medida através do aparecimento de setores em colônias isoladas. A maior estabilidade é obtida após a primeira irradiação.

Summary

Gamma-rays and instability of Aspergillus niger

A strains of *Aspergillus niger* used for citric acid production was submitted to gamma-rays multiple irradiation and the instability of the strain was measured by the production of sectors from isolated colonies following each irradiation. The greater stability is achieved after the first irradiation.

Introdução

O fungo *Aspergillus niger* apresenta grande importância industrial na produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido cítrico. Um dos problemas relativos à produção de ácido cítrico, refere-se à queda ou flutuações na produção, sendo a instabilidade da linhagem empregada, um dos fatores responsáveis por estas alterações como já foi verificado por diversos autores (7, 8, 10). Apesar da importância econômica de *A. niger*, para produção de ácido cítrico, são ainda poucos os estudos que se referem à instabilidade de linhagens desse fungo (6, 9, 13). Como salientam Ball & Azevedo (4), a instabilidade genética constitui importante problema para a indústria de fermentação, não somente como fator indesejável na queda de produção, mas também um meio útil de melhorar o rendimento, uma vez que a variabilidade apresentada pode ser empregada no melhoramento genético. No presente trabalho, investigou-se o possível efeito da radiação gama (fonte de Cobalto 60), sobre a instabilidade de uma linhagem de *A. niger*, de origem industrial.

Material e Métodos

Cultivo — A linhagem 10V10 de *A. niger*, de origem industrial foi cultivada em meio Czapecck-Dox modificado (11), constituído de NaNO_3 (6 g), KH_2PO_4 (1,5 g), KCl (0,5 g), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), traços de FeSO_4 e ZnSO_4 , Glicose (10 g) e Ágar (15 g). Os componentes foram adicionados em um litro de água destilada, o pH ajustado para 6,8 e o meio autoclavado 15 minutos a 120°C.

Irradiação — Foi utilizada a fonte de Cobalto 60 do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Piracicaba, São Paulo. Conídios do fungo foram submetidos a tempo de irradiação correspondente à dose de 80Kr. Após a primeira irradiação, os conídios foram semeados em diluições apropriadas, de modo a permitir o crescimento de colônias isoladas. Os mesmos conídios foram submetidos a mais duas irradiações, nas mesmas doses utilizadas anteriormente e, também após cada irradiação, os conídios foram semeados de modo a dar colônias

* Trabalho realizado com auxílio financeiro do CNPq, especialmente pelo Programa Integrado de Genética.

** Departamento de Biologia, UFPB, João Pessoa, PB, Brasil

*** Departamento de Genética e Evolução, UNICAMP, Campinas, SP, e Instituto de Genética, ESALQ, Univ. S. Paulo, Brasil.

isoladas. Conídios não irradiados foram usados como controle.

Ensaio da instabilidade — A instabilidade foi medida através de setores produzidos por colônias provenientes de conídios irradiados e não irradiados. Conídios de cada uma de 50 colônias, provenientes de esporos não irradiados, foram inoculados no centro de igual número de placas de Petri contendo o meio utilizado. Igual procedimento foi usado para colônias provenientes de conídios submetidos a uma, duas e três irradiações, no total, portanto, de 200 placas (50 para o controle e 50 após cada irradiação).

As placas foram incubadas a 28°C, por 10 dias, efetuando-se, após esse período de tempo, a contagem de colônias, com e sem setores.

Resultados e Discussão

O número de colônias, com setores provenientes de esporos não irradiados, e irradiados, está apresentado na Tabela 1. Os dados referentes ao número de colônias, com setores, foram transformados em $\sqrt{X} + 0,5$, para fins de análise de variância. A Tabela 2 mostra a análise

Tabela 1 — Número de colônias com setores produzidas pela linhagem 10V10 de *Aspergillus niger*, após irradiações com raios gama (80 Kr)

Tratamento	Número de colônias com setores*				
	10(3,2403)**	10(3,2403)	8(2,9154)	10(3,2403)	9(3,0822)
Controle	10(3,2403)**	10(3,2403)	8(2,9154)	10(3,2403)	9(3,0822)
1 ^a irradiação	4(2,1213)	6(2,5495)	3(1,8708)	5(2,3452)	6(2,5495)
2 ^a irradiação	8(2,9154)	6(2,5495)	9(3,0822)	7(2,7386)	10(3,2403)
3 ^a irradiação	9(3,0822)	8(2,9154)	9(3,0822)	8(2,9154)	10(3,2403)

* 50 colônias ensaiadas (5 grupos de 10) para cada tratamento

** O número entre parênteses é a transformação de cada valor em $\sqrt{X} + 0,5$

Tabela 2 — Análise de variância para instabilidade da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger*, após irradiações com raios gama (80 Kr)

Fonte de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	3	2,2238	0,7412	14,8835**
Resíduo	16	0,7982	0,0498	
c.v. = 7,84%				

** significativo ao nível de 1%

Tabela 3 — Médias de colônias com setores comparadas pelo teste de Tukey

Tratamento	Médias*
Controle	3,1437 a
1 ^a irradiação	2,2872 b
2 ^a irradiação	2,9052 a
3 ^a irradiação	3,0471 a

D.M.S. 5% = 0,3968

* Valores seguidos da mesma letra não são diferentes entre si ao nível de 5%

se de variância para a instabilidade da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger*, após irradiações com raios gama. A Tabela 3 apresenta as comparações de médias de colônias com setores, pelo teste de Tukey. Os resultados obtidos indicam, em primeiro lugar, que a linhagem 10V10 de *A. niger* é bastante instável, o que, aliás, está de acordo com resultados anteriores, que mostram que essa linhagem tem altas flutuações na produção de ácido cítrico e produzem setores (5). A queda de produção, de colônias com setores, após a primeira irradiação, foi estatisticamente significante. Uma explicação, para esses resultados, talvez possa ser dada através de resultados obtidos em trabalhos anteriores (5, 12) que mostraram ser a linhagem 10V10 possivelmente heterocariótica, contendo dois núcleos de constituição genética diversa. Assim, após a primeira irradiação, pode-se suspeitar o aparecimento de sistema de letais balanceados (2), onde cada núcleo contém um letal recessivo. Esses conídios, com letais balanceados, darão colônias estáveis, uma vez que qualquer segregação para homocariorose será letal. Por outro lado, doses maiores de irradiação, além de induzirem letais, produzem também aberrações cromossômicas em maior quantidade.

de e sabe-se que estas são responsáveis por instabilidade mitótica em fungos (1, 3). Assim, para a finalidade de se obter linhagens mais estáveis, de interesse industrial, os resultados do

presente trabalho indicam que isso pode ser conseguido com doses menores de irradiação e, menos freqüentemente, com doses maiores e irradiação múltipla.

Referências Bibliográficas

1. Azevedo, J. L. — Altered instability due to genetic changes in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res.*, 26:55-61, 1975.
2. Azevedo, J. L. & Roper, J. A. — Lethal mutations and balanced lethal systems in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 49:149-155, 1967.
3. Azevedo, J. L. & Roper, J. A. — Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: sucessive and transposable genetic changes. *Genet. Res.*, 16:79-93, 1970.
4. Ball, C. & Azevedo, J. L. — Genetic instability in par-sexual fungi. In: MacDonald, K.D. — *Symp. Int. Genet. Ind. Microrg.* 2nd ed. New York, Academic Press, p. 243-251, 1976.
5. Bonatelli Jr., R. — Estabilidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. ESALQ, Univ. S. Paulo, Piracicaba, SP, p. 126, 1977. (Tese de Mestrado).
6. Bonatelli Jr., R. & Azevedo, J. L. — Instabilidade em *Aspergillus niger*. *Rel. Cient. Inst. Genet. ESALQ*, Univ. S. Paulo, 7:47-48, 1974.
7. Gardner, J. F.; James, L. V. & Rubbo, S. D. — Production of citric acid by mutants of *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.*, 14:228-237, 1956.
8. Millis, N. F.; Trumpp, B. H. & Palmer, B. M. — The effects of lipids on citric acid production by *Aspergillus niger* mutant. *J. Gen. Microbiol.*, 30:365-379, 1963.
9. Nga, B. H.; Teo, S. P. & Lim, G. — The occurrence in nature of a diploid strain of *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.*, 88:364-366, 1975.
10. Perlman, D. & Sih, J. C. — Fungal synthesis of citric, fumaric and itaconic acids. *Progress Ind. Microbiol.*, 2:168-194, 1960.
11. Pontecorvo, G.; Roper, J. A.; Hemmons, L. M.; MacDonald, K. D. & Button, A. W. J. — The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, 5:141-238, 1953.
12. Silva, J. C. — Seleção de *Aspergillus niger* para produção de ácidos. Univ. Est. Campinas, Campinas, p. 91, 1977. (Tese de Mestrado).
13. Yuill, J. L. — Culture study of an unstable strain of *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.*, 9:V.

Kinetic behavior of soluble fungal alpha amylase from *Aspergillus niger*

R. M. Attia*
 Rawia F. Gamal**
 & A. M. Dokhan*

Summary

The kinetic behavior of fungal alpha amylase was investigated. The enzyme from a local isolate of *Aspergillus niger* (R-2347). The order of the reaction followed zero order. The heat inactivation followed second-order reaction. The apparent temperature optimum fell at about 40°C. The heat of the reaction (ΔE), accompanied by the process has been calculated from the slope of the Arrhenius equation to be 26100 cal/mole. The standard free energy change (ΔG) and the standard entropy change (ΔS) were found to be -1206 cal/mole and +90.2 cal/mole/degree at 30°C. The values of thermodynamics quantities at other temperatures also discussed. The pH optimum was at 4 - 5. The changes in the state of ionization of the free enzyme or substrate not affect the maximum velocity. Michaelis constant (K_m) was calculated at different pHs. The enzyme has one ionizing group at pK 4.425 being a carboxyl group, i.e. aspartic, glutamyl.

Introduction

Alpha amylase from molds catalyses the alpha 1,4 glucan links in polysaccharids containing three or more alpha-1,4 linked D-glucose units (4). It also attacks starch, starch derivatives, glycogen, related polysaccharide and oligosaccharides in a random manner (4).

This paper studied the kinetic behavior of soluble fungal alpha amylase from a local strain of *Aspergillus niger*, R-2347.

Material and Methods

Organism — A preliminary screening program for high alpha amylase producing molds grown in submerged culture, indicated that *Aspergillus niger* (R-2347) was one of the most active. Stock cultures were maintained on yeast malt agar slants (5) and transferred at 4 weeks intervals.

Culture conditions — Culture of *A. niger* R-2347, employed in this study, was grown in 250 ml baffled Erlenmeyer flasks, containing 50 ml portions of 15% whole ground N° 1 yellow corn and 2% corn steep liquor (2) at a pre-

sterilization pH of 4.5. After they were autoclaved at 120°C for 20 minutes, the flasks were inoculated with 0.1 ml of the spore suspension and then incubated on reciprocating shaker at 28°C for 4 days. At the end of fermentation period, the culture was clarified and centrifuged.

Enzyme purification — After the culture supernatant was passed through a Seitz filter to remove spores, it was concentrated 10 fold under vacuum at 40°C. The concentrate was brought to 25% saturation with ammonium sulfate by slow addition of the salt and simultaneous stirring. After keeping the mixture at 5°C for 30 minutes, the precipitate was removed by centrifugation at 10000 xg for 15 minutes and discarded. The supernatant was then brought to 60% saturation with ammonium sulfate and allowed to stand overnight at 5°C. The precipitate was collected and re-disolved in a minimum amount of distilled water. The solution was dialyzed against distilled water at 5°C. Further purification was made by DEAE-cellulose chromatography.

Order of reaction — 40 ml enzyme solution, contained 4 SKB units, were added to 20 ml of 0.5% Zulk. starch at pH 4.7. The mixture was

* Microbiol. Res. Dept., Agric. Research Centre of Egypt.

** Microbiol. Dept., Fac. of Agric., Ain Shams Univ., Egypt, ARE.

incubated at 30°C in a waterbath regulated to 0.05°C and stirred continuously. 3 ml aliquots were removed at 5 minutes intervals for enzyme determination by the method of Attia & Samia (1).

Reaction order of heat inactivation — The enzyme in acetate buffer at pH 4.7 was rapidly brought to 60°C in a waterbath regulated to 0.05°C and stirred continuously. Aliquots were removed at 5 minutes intervals and immediately cooled in a freeze mixture to 10°C, and the enzyme velocity was determined (1).

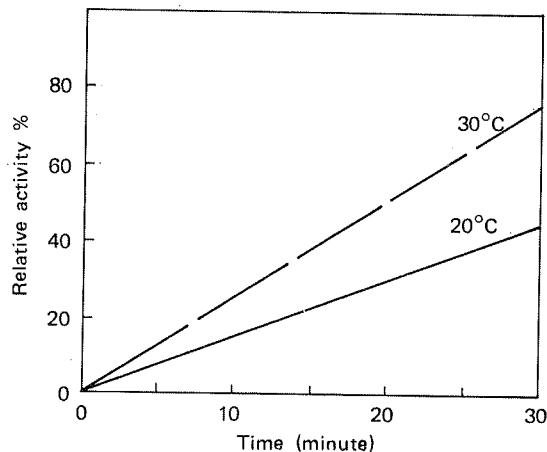
Temperature optimum — Mixtures containing 3×10^{-2} M Zulkowsky starch in acetate buffer at pH 4.7 and the enzyme to be tested, were incubated at various temperatures within 20°-70°C. After incubation period of 5 minutes, the enzyme velocity was determined (1).

Enzyme assay — The method of Attia & Samia (1), was used and it is summarized as follows: to 1 ml of 0.5% Zulkowsky starch in acetate buffer at pH 4.7, 2 ml of the enzyme solution was added. The mixture was incubated at 30°C for 5 minutes. At the end of incubation period, 1 ml of iodine reagent was added and the transmittance (T%) was measured at 660 nm.

Results

Order of reaction — When the enzyme velocity was plotted against time as in figure 1, a linear relationship was obtained for 30 minutes. Addition of more substrate neither restored the rate nor stabilized the enzyme. This linear relation, indicates that the order of the reaction followed

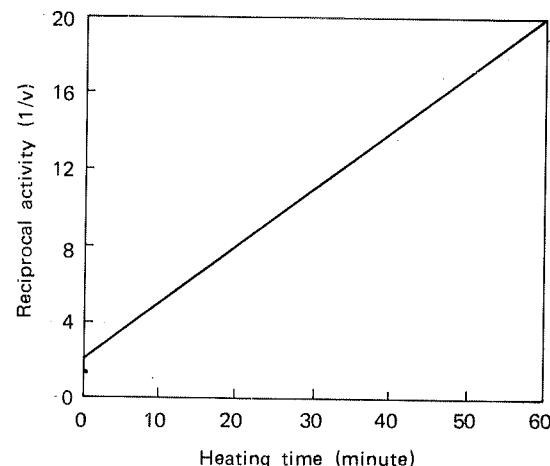
Figure 1 — Time course of the hydrolysis of starch by fungal alpha amylase



zero order. For these reasons precautions were taken whenever possible, to keep the reaction time within the limits where a constant rate of zero order was observed.

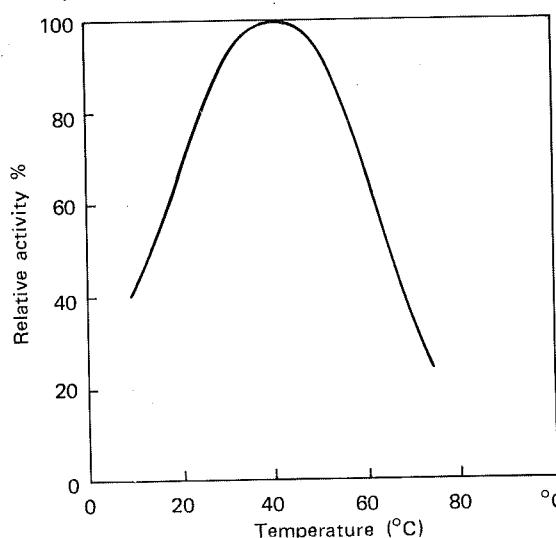
Reaction order of heat inactivation — The heat stability of an enzyme is best expressed in terms of the energy of inactivation under specified conditions. To calculate this, it was first necessary to determine the reaction order of the heat inactivation of fungal alpha amylase. When the velocity was plotted against the time of heating at 60°C, this did not yield a linear relationship and neither did a plot of the log velocity against time of heating. Hence the heat inactivation was not a zero or first order reaction. When the reciprocal of the velocity was plotted against the time of heating, however, a straight line relationship was obtained as in figure 2, indicating that the heat inactivation of this fungal alpha amylase followed a second order reaction. The finding of a heat inactivation of second order for this enzyme was rather unexpected, as most enzymes follow a first order reaction in heat inactivation (6).

Figure 2 — Inactivation of fungal alpha amylase as a second order process



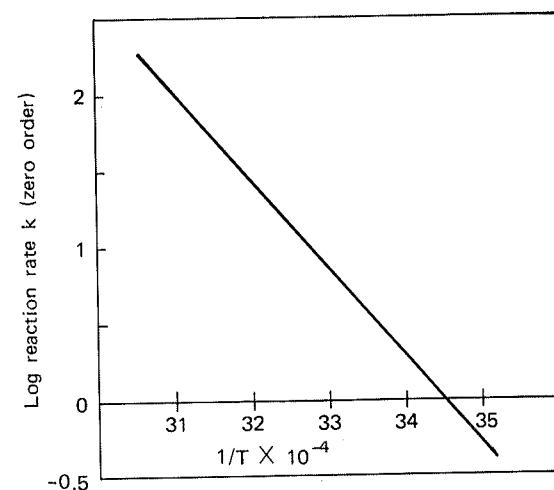
Temperature optimum — Figure 3, is a plot of the relative activity of the observed reaction, rate at various temperatures, under the standard conditions (substrate, 3×10^{-2} M Zulk. starch ; acetate buffer at pH 4.7 ; vol. 3 ml ; time 5 minutes). Figure 3 shows that the apparent temperature optimum fell at about 40°C. Since the enzyme was stable up to this temperature for short periods of time, an increase in the rate was manifest, but at 40°C and higher temperatures the rate fell off sharply since denaturation of the enzyme exceeded the increase in the rate of the catalyzed reaction.

Figure 3 — Effect of temperature on fungal alpha amylase activity



Energy of activation — The Arrhenius equation ($\log k = -E/1n R - 1/T + \text{constant}$), predicts that when the log of the specific reaction rate (k) is plotted against the reciprocal of the absolute temperature (T), a straight line relation should obtain (Figure 4). The slope of the line, multiplied by 4.58 is the energy of activation of the forward reaction (E) under the experimental

Figure 4 — Effect of temperature on the heat activity of fungal alpha amylase ($\Delta E = 26100 \text{ cal/mole}$)



conditions. The heat of the forward reaction (ΔE), accompanied by the process has been calculated from the slope of the plot to be $+26100 \text{ cal/mole}$.

The standard free energy change of the reaction (ΔG) is given by the equilibrium constant of:

$$\Delta G = -RT - \ln k$$

Table 1 — Thermodynamic quantities of soluble fungal alpha amylase at various temperature

Temperature 0°C	$(1/T) \times 10^4$	ΔE cal/mole	ΔG cal/mole	ΔS cal/mole/degree
10	35	26100	+ 413	+ 90.9
20	34	26100	- 364	+ 90.4
30	33	26100	- 1206	+ 90.2
40	32	26100	- 2078.6	+ 90.1
50	31	26100	- 2958.7	+ 90.1

The standard entropy change (ΔS) of the enzyme can be obtained from the following equation:

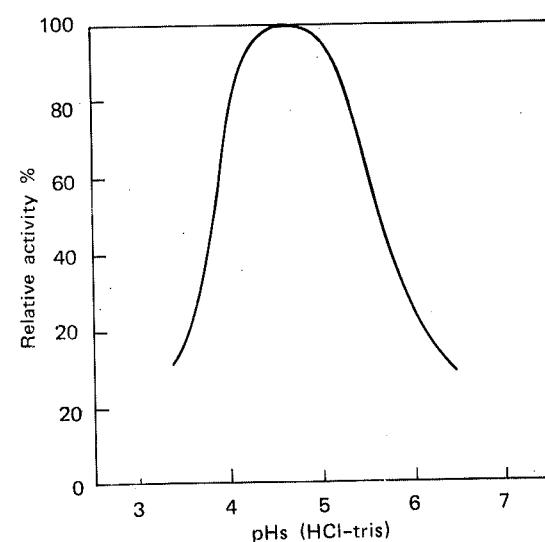
$$\Delta S = (E - G) / T$$

The values of both ΔG and ΔS are clearly shown in table 1.

Effects of pHs — As shown in figure 5 the optimum pH was at 4.5. Such bell-shaped curve may be the result of variation of either V_{max} or K_m with pH, or they may represent an irreversible inactivation at extremities of pH. To illustrate this, an experiment was done to clear the effect of pH on V_{max} and K_m .

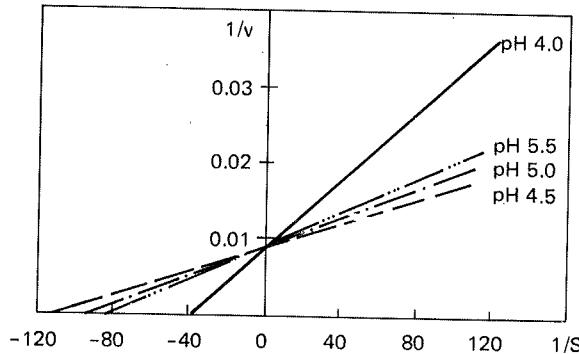
A series of velocity measurements at different pHs with a sufficiently high substrate concentration were carried out.

Figure 5 — Effect of pHs on the activity of fungal alpha amylase



This was done to saturate the enzyme in all cases, to eliminate any effects on the affinity, and the whole of the enzyme is in the form of (ES) complex and since the velocity of the reaction is simply the rate of breakdown of the complex into free enzyme and product. In this case, the effect of pH on V_{max} will be determined only by the state of ionization of the complex. Figure 6 shows that changes in the state of ionization of the free enzyme or substrate not affect the maximum velocity.

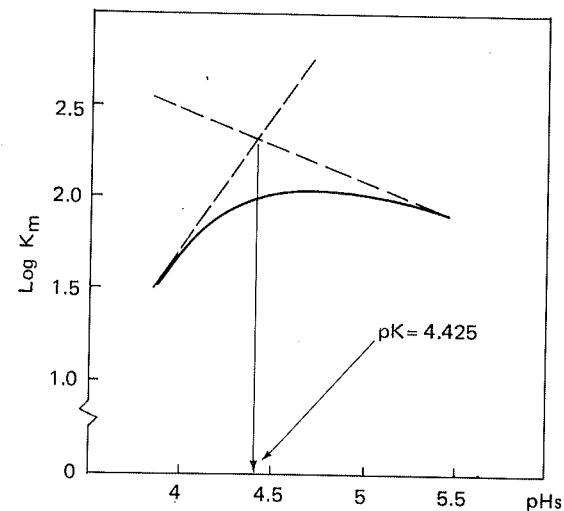
Figure 6 — Effect of pH on V and K_m for fungal alpha amylase acting on Zulk. starch (Lineweaver-Burk plot of the inhibition effect of pHs)



On the other hand they affect K_m . Thus K_m was equal to 0.0250, 0.0091, 0.0104 and 0.0119 at pHs 4, 4.5, 5 and 5.5 respectively.

The effect of pH on V_{max} and K_m seems to be competitive.

Figure 7 — Effect of pH on K_m for fungal alpha amylase activity



If we plot $\log K_m$ against pH as in figure 7, we obtain a graph where the parameter K_m has a sigmoid pH profile, in which K_m depends on one ionizing group at pH 4.425. This pK value (4.425) indicates that the ionizing group present in fungal alpha amylase is a carboxyl group, i.e. aspartyl, glutamyl, which is ionized at pH 3.0-4.7 (3, 7). These results show that there is only one pK of the ES-complex in the range tested and there is no optimum pH for maximum velocity which simply rises to a constant maximum value.

References

- Attia, R.M. & Samia A.A. — Simple and rapid colorimetric method for the microdetermination of alpha amylase. *Zbl. Bakt. II. Abt. Bd.*, 132:193-195, 1977.
- Cadmus, M.C.; Jayko, L.G.; Hensley, D.E.; Gasdorf, H. & Smiley, K.L. — Enzymatic production of glucose syrup from grains and its use in fermentations. *Cereal Chemistry*, 43:658-669, 1966.
- Dixon, M. & Webb, E.C. — Enzymes. 2nd ed. London, Spottiswoods, Ballantyne, 1964.
- Florkin, M. & Elmer, H. Stotz. — Comprehensive biochemistry. New York, Elsevier Publishing, vol. 13, 1964.
- Haynes, W.C.; Wickerham, L.J. & Hesseltine, W. — Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. *Appl. Microbiol.*, 3:361-368, 1955.
- Sizer, I.W.; Nord, F.F. & Werkman, C.H. — Advances in Enzymol. 3:35, 1943.
- Zeffren, E. & Hall, P.L. — The Study of enzyme mechanisms. New York, John Wiley, 1972.

Ocorrência de grupos sorológicos de *Escherichia coli* na flora intestinal*

Elsa Fuchshuber Rodrigues de Oliveira
 Elizabeth de Andrade Marques
 & Ítalo Suassuna

Resumo

Foram testadas, pela técnica de aglutinação rápida em lâmina, 250 amostras de *E. coli* isoladas de fezes, visando a determinação da especificidade de seu antígeno somático. As amostras foram obtidas de pacientes hospitalizados e de pessoas sem contato hospitalar. Para a caracterização do antígeno somático foram empregados 16 antisoros, correspondentes aos sorogrupo 01, 02, 04, 06, 07, 011, 015, 020, 022, 023, 050, 062, 071, 075, e 0135. Das amostras testadas, foi possível determinarmos o sorogrupo de 33,2%, correspondentes aos sorogrupo 06, 062, 050, 015, 075, 011, 018, 01, 07. Mostraram-se mais freqüentes os portadores intestinais dos sorogrupo 06 e 062, isolados respectivamente de 10,0% e 17,1% das pessoas estudadas. Não encontramos diferença significativa nas taxas de portadores intestinais dos sorogrupo caracterizados em relação aos grupos de indivíduos estudados.

Summary

Serogroups of intestinal Escherichia coli

About 250 strains of *E. coli* isolated from feces of hospitalized patients and persons of the community were tested, by the slide agglutination technique, employing 16 O-antisera (01, 02, 04, 06, 07, 011, 015, 020, 022, 023, 050, 062, 071, 075 and 0135). So we could determine the O serogroup of 33,2% of the tested strains. Considering the intestinal carrier rate of the various serogroups, the more frequently found were those carriers of serogroups 06 (10,0%) and 062 (17,1%). We could not find any difference in the carrier state rate of the various serogroups among different groups of patients studied.

Introdução

Entre as bactérias que causam infecção urinária, *Escherichia coli* é sem dúvida, o agente que ocorre com maior freqüência. A grupagem sorológica de amostras de *E. coli*, isoladas de urina, tem demonstrado que, apesar da existência de grande variedade de sorogrupo, a maioria das infecções urinárias é ocasionada por número restrito de sorogrupo (6, 7, 12, 13). Em nosso meio foram encontrados, como mais prevalentes, os sorogrupo 06, 062, 07 e 075(5).

A maior prevalência desses sorogrupo, associados à infecção urinária, não foi ainda esclarecida. Diversos autores advogam que alguns sorogrupo seriam mais comuns por apresentarem características de maior patogenicidade (3, 11), enquanto outros tentam justificar

o fato pela ocorrência daqueles sorogrupo disseminados de forma mais ampla na natureza (8, 11).

A investigação desta segunda possibilidade tem sido realizada sobretudo em relação à flora intestinal, seja pela sua proximidade com o trato urinário, assim como pela importância da via ascendente, como forma de contaminação das vias urinárias.

Em relação a estudos da flora intestinal, têm-se conseguido estreita correlação entre os sorogrupo causadores do processo infeccioso e sua presença no trato intestinal (8, 13). No entanto, faz-se necessário levar em consideração a possibilidade de contaminação retrógrada. O esclarecimento desta situação exige investigação dos sorogrupo de *E. coli* mais comuns no conteúdo intestinal de população sã. Neste sentido, poucos são os estudos disponíveis em

* Cadeira de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas da UERJ, 20.000 Rio de Janeiro, RJ.

que se tenha feito a comparação destes achados em indivíduos de uma população, não sendo ainda permissíveis conclusões definitivas (12, 13).

Dados obtidos por alguns autores sugerem a maior ocorrência dos sorogrupos mais freqüentes em infecções urinárias na flora intestinal de indivíduos hospitalizados, constituindo portanto flora nosocomial. Kennedy, Plorde & Petersdorf (4) encontraram os sorogrupos 04, 06 e 075 em 40% das pessoas internadas em hospital por mais de 10 dias, taxa esta que reduziu a 15% quando considerados indivíduos sem contato hospitalar. Constituiu ainda motivo de discussão, a maior ocorrência destes sorogrupos em ambiente hospitalar, havendo evidências de que o uso de antibióticos seja fator importante (14).

Em nosso estudo, procuramos averiguar se ocorria o predomínio dos sorogrupos de *E. coli* encontrados mais freqüentemente como agentes de infecções urinárias, na flora intestinal de pessoas em contato com ambiente hospitalar e na de indivíduos alheios ao mesmo ambiente.

Material e Métodos

A colheita do material foi efetuada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da U.E.R.J. para os pacientes hospitalizados e nas residências das pessoas correspondentes ao grupo sem contato com ambiente hospitalar. Este grupo correspondeu a indivíduos residentes na cidade do Rio de Janeiro, de ambos os sexos, e cuja idade variava de 20 a 50 anos.

Em nenhum dos casos havia suspeita clínica de infecção urinária nem se encontrava em uso de antibiótico.

As amostras de fezes foram colhidas em salina glicerinada (2), perfazendo um total de 70, sendo 20 oriundas de pessoas não hospitalizadas e 50 de pacientes hospitalizados, sempre em período superior a 5 dias.

Os espécimes foram semeados por esgotamento em meio de Holt-Harris & Teague (Merck). De cada placa foram isoladas de cinco a dez amostras com características coloniais de *E. coli*, sendo então semeadas nos meios de duplo-açúcar-uréia (10) e SIM (Difco), para identificação bioquímica.

O preparo dos antígenos, das amostras de *E. coli*, seguiu as técnicas recomendadas por Edwards & Ewing (2), após seleção de formas

bacterianas lisas, pela prova de termoestabilidade (aquecimento a 100°C, por 2 horas e 30 minutos, em vapor fluente).

Os antissoros empregados na sorogrupagem das amostras de *E. coli*, corresponderam aos sorogrupos 01, 02, 04, 06, 07, 011, 015, 020, 022, 023, 050, 062, 071, 075 e 0135 e foram, na sua maioria, preparados em nosso laboratório, exceto aqueles dos sorogrupos 01, 02, 04 e 022, obtidos comercialmente (Difco).

No preparo dos antissoros, foram seguidas as técnicas descritas por Edwards & Ewing (2). Na caracterização sorológica das amostras de *E. coli*, isoladas de fezes, foi utilizada a técnica de aglutinação rápida, em lâmina, dos mesmos autores.

A análise estatística dos resultados encontrados foi feita pelo teste do χ^2 .

Resultados

Das 350 amostras de *E. coli*, isoladas de fezes, 100 mostraram-se autoaglutináveis ao teste de termoestabilidade, não sendo portanto submetidas a exame sorológico. De 250 amostras lisas, 155 eram provenientes de 50 indivíduos hospitalizados e 95 de 20 pessoas sem contato com ambiente hospitalar.

Submetendo-se as amostras lisas à prova de aglutinação em lâmina, pudemos determinar o sorogruppo de 33,2% das amostras testadas. Tivemos na amostragem, 12% de amostras reativas não grupadas, que corresponderam aquelas que reagiram com dois ou mais antissoros.

Ao analisar a distribuição dos diversos sorogrupos identificados, em relação ao número de indivíduos, a partir de cujo conteúdo intestinal se obteve amostras sorologicamente grupáveis, pudemos caracterizar a maior taxa de portadores do sorogruppo 062, seguindo-se, em ordem

Tabela 1 — Distribuição dos sorogrupos 0 de *E. coli* em espécimes fecais de 70 indivíduos (Rio de Janeiro, Brasil — 1976)

Sorogruppo 0	Nº de portadores	Percentual
062	12	17,1%
06	7	10,0%
050	6	8,5%
015	3	4,2%
075	1	1,4%
011	1	1,4%
01	1	1,4%
07	1	1,4%
TOTAL	32	45,4%

Tabela 2 — Distribuição dos sorogrupos 0 de *E. coli* isolados de fezes de pacientes hospitalizados e de pessoas da comunidade (Rio de Janeiro, Brasil — 1976)

Sorogrupos	Pacientes hospitalizados*		Pessoas da comunidade**	
	Número	Percentual	Número	Percentual
062	8	16%	4	20%
06	5	10%	2	10%
050	4	8%	2	10%
015	1	3%	2	10%
075	0	—	1	5%
011	0	—	1	5%
07	1	3%	0	—
01	0	—	1	5%
TOTAL	19	40%	13	65%

* Total de 50 pacientes hospitalizados

** Total de 20 pessoas da comunidade

decrescente de freqüência, os portadores intestinais dos sorogrupos 06, 050 e 015. Não encontramos, entre as amostras testadas, representantes dos sorogrupos 02, 04, 020, 022, 023, 071 e 0135.

Procuramos também averiguar a distribuição dos portadores intestinais dos diferentes sorogrupos, em relação à classe de pessoas estudadas (Tabela 2), o que nos permitiu concluir não haver diferença na taxa dos portadores intestinais, em relação a pessoas da comunidade ou pacientes hospitalizados ($P > 0,05$).

Discussão

Apesar de ser fato conhecido, há mais de duas décadas, que apenas alguns sorogrupos de *E. coli*, dentre os 148 existentes, são isolados com maior freqüência, a partir de casos de infecção urinária, a causa desta predominância é ainda motivo de discussão.

Uma possibilidade seria sua maior freqüência no trato intestinal, sendo necessária, para a comprovação desta circunstância, a investigação da constituição sorológica dos representantes de *E. coli* na flora intestinal de pessoas sãs.

Em nosso estudo, considerando-se o número global de pessoas que tiveram estudada a composição antigênica das amostras de *E. coli* no seu conteúdo intestinal, observamos serem mais freqüentes os portadores dos sorogrupos 062 e 06, presentes em 17,1% e 10% dos espécimes analisados. Comparando-se estas taxas às encontradas com amostras isoladas de urina (5), observa-se que os resultados são semelhantes, tendo sido caracterizados 14,5% como

pertencentes ao sorogrupo 06 e 8,0% ao sorogrupo 062.

São escassos os dados de estudos comparativos, visando estabelecer correlação entre a freqüência de sorogrupos de *E. coli* na flora intestinal de pessoas sãs e em urina, de uma população. Além disso, os resultados são ainda conflitantes. Vosti & col. (13) encontraram os sorogrupos 04, 06 e 050 na urina de 40% dos pacientes com infecção e apenas 19,6% das fezes de indivíduos sãos. Por outro lado, Turck & Petersdorf (12) identificaram os sorogrupos 06, 075, 04 e 01 em 57% dos espécimes de urina e em 49,4% das fezes de pessoas sãs.

Nossos dados sugerem que, em relação aos sorogrupos 06 e 062, sua maior prevalência em infecções urinárias esteja ligada a maior distribuição no trato intestinal de pessoas sãs.

Por outro lado, os sorogrupos 07 e 075, considerados como terceiro e quarto mais freqüentes em urina (5), estiveram presentes nas fezes em poucas ocasiões, não nos permitindo justificar sua maior freqüência em infecções do trato urinário pela sua ubiquidade.

Comparando-se a taxa de portadores intestinais dos sorogrupos caracterizados, em pessoas não ligadas a hospitais e pacientes em ambiente hospitalar, não detectamos diferença significativa para os vários sorogrupos. Estes resultados diferem dos obtidos em investigações anteriores, que haviam evidenciado a existência de flora nosocomial, em relação a determinados sorogrupos de *E. coli*. Turck & Petersdorf (12) verificaram que em pacientes hospitalizados, é mais freqüente o estado de portador dos sorogrupos mais prevalentes em infecções urinárias, que em indivíduos sem contato hos-

pitalar. A aquisição destes sorogrupos por pacientes, em hospital, parece estar ligada à colonização intestinal pela ingestão de alimentos contaminados (1), não havendo evidências de contaminação cruzada (14).

Algumas investigações têm procurado esclarecer o motivo pelo qual determinados sorogrupos estão mais aptos a se instalar no trato intestinal, predominando sobre os demais. A verificação de que estes sorogrupos eram mais comuns em pessoas em uso de antibióticos fez surgir a possibilidade de se tratar de um problema relacionado ao nível de sensibilidade destas amostras a diferentes antibióticos. Porém, verificou-se que, "in vitro", eram também sensíveis aos antimicrobianos em uso pelos pacientes, afastando portanto esta hipótese (14). A produção de colicinas, por amostras daqueles sorogrupos, fazendo-as sobrepujar as demais,

foi também analisada, porém os resultados não forneceram conclusões definitivas (9).

Concluindo, podemos anotar as seguintes informações tiradas do presente estudo: a análise sorológica da população de *E. coli* do conteúdo intestinal de pessoas sem infecção urinária mostrou-nos serem mais freqüentes os portadores intestinais dos sorogrupos 062 e 06; não encontramos diferença significativa na taxa de portadores intestinais dos sorogrupos de *E. coli* caracterizados, em relação aos pacientes hospitalizados ou pessoas sem contato com hospital; o encontro dos sorogrupos 062 e 06, como predominantes na flora intestinal, coincide com os dados obtidos pela sorogrupagem de amostras de *E. coli* isoladas de urina, onde mostram ser também os mais comumente presentes, justificando-se que sua ubiquidade permite seu maior acesso ao trato urinário.

Referências Bibliográficas

1. Cooke, E.M.; Kumar, P.J.; Shooter, R.A. & Rousseau, S.A. — Hospital food as a possible source of *E. coli* in patients. Lancet, 1:436-437, 1970.
2. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. — Identification of *Enterobacteriaceae*. 3th ed. Minneapolis, Burgess Publishing Co., 1972.
3. Kauffman, F. — The serology of the coli group. J. Immunol., 57:71-100, 1947.
4. Kennedy, R.P.; Plorde, J.J. & Petersdorf, R.G. — Evidence for a nosocomial gram-negative flora. J. Clin. Invest., 44:193-201, 1965.
5. Oliveira, E.F.R. — Associação de grupos sorológicos de *E. coli* com infecções urinárias. Instituto de Microbiologia da U.F.R.J. Rio de Janeiro, 1975 (Tese de Mestrado).
6. Rantz, L.A. — Serological grouping of *Escherichia coli*. Arch. Int. Med., 109:37-43, 1962.
7. Riley, P.D. & Riley, H.D. — Serotypes and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* in non-enteric infections in children. Scand. J. Infect. Dis., 5:187-191, 1973.
8. Schwartz, H.; Schrimmer, H.K.; Post, B. & Ehlers, B. — Correlations of *Escherichia coli* occurring simultaneously in urine and stool of patients with clinically significant bacteruria: serotyping with group specific O antisera. J. Urol., 101:379-382, 1969.
9. Sears, H.J.; Brownlee, I. & Uchiyama, J. — Persistence of individual strains of *Escherichia coli* in the intestinal tract of man. J. Bacteriol., 59:293-301, 1950.
10. Suassuna, I.; Lourenço, N.J. & Noleto, A.L.S. — Glucose-lactose-uréia: uma modificação do meio de Montevideo e o seu emprego em bacteriologia clínica. An. Microbiol., (Rio de Janeiro) 16:194, 1969.
11. Taylor, P.W. — Sensitivity of some smooth strains of *Escherichia coli* to the bactericidal action of normal human serum. J. Clin. Pathol., 27:626-629, 1974.
12. Turck, M. & Petersdorf, R.G. — The epidemiology of non-enteric *Escherichia coli* infections: prevalence of serological groups. J. Clin. Invest., 41:1760-1765, 1962.
13. Vosti, K.L.; Goldberg, L.M.; Monto, A.S. & Rantz, L. A. — Host-parasite interaction in patients with infections due to *Escherichia coli* from intestinal and extra-intestinal sources. J. Clin. Invest., 43:2377-2385, 1964.
14. Winterbauer, H.H.; Turck, M. & Petersdorf, R.G. — Further evidence for epidemiological virulence of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother, 1965: 71-76, 1966.

**Isolamento de uma amostra
de *Yersinia enterocolitica*
das fezes de uma criança,
na cidade de São Paulo**

Fontes, C. F.*
Toledo M. R. F.*
Reis, M. H. L.*
Murahovschi, J.**
& Trabulsi, L. R.*

Resumo

Uma amostra de *Yersinia enterocolitica* 03 foi isolada das fezes de uma criança na cidade de São Paulo. Tanto quanto sabemos, trata-se da segunda amostra de *Y. enterocolitica*, de origem humana, isolada na América do Sul.

Summary

Isolated strain of Yersinia enterocolitica from feces of a child in São Paulo City, Brazil

A strain of *Yersinia enterocolitica* 03 was isolated from feces of a child in São Paulo City, Brazil. As far as we know this is the second isolate of *Y. enterocolitica* of human origin, in South America.

Yersinia enterocolitica, a partir de 1972 incluída na família Enterobacteriaceae (Mollaret, H. H. & Knapp, W. — Int. J. Syst. Bacteriol., 22: 401, 1972), tem sido responsabilizada, cada vez mais, como agente de infecções no homem. As mais variadas formas clínicas têm sido relatadas, embora dois terços dos casos de infecção apareçam sob a forma de enterocolites, afetando principalmente crianças (Mollaret, H. H. — Ann. Biol. Clin., 30:1-6, 1972).

A amostra de *Yersinia enterocolitica* (275 CII/77) foi isolada a partir das fezes de uma criança sem sintomatologia gastrointestinal, na cidade de São Paulo. O isolamento foi feito em placa de SS agar, incubada a 37°C por 24 horas, embora as fezes tivessem sido também semeadas em placas de MacConkey e Hektoen. Os mesmos meios de isolamento foram utilizados, com incubação a 28°C. A leitura das placas foi feita após 24 e 48 horas. Na placa de SS as colônias se apresentaram com cor clara, puntiformes, lisas e brilhantes. Suas características bioquímicas coincidiam com as de *Y. enterocolitica* (Tabela 1). A tipagem sorológica realizada pela Dra. Deise P. Falcão, da Faculda-

Tabela 1 — Características bioquímicas da amostra 275 CII/77

Teste ou substrato	Reação	Teste ou substrato	Reação
H ₂ S (TSI)	-	Salicina	-
Indol	-	Inositol	+ 11
VM - 28°C	+	Sorbitol	+
VM - 37°C	+	Arabinose	+
VP - 28°C	-	Rafinose	-
VP - 37°C	-	Ramnose	-
Citrato Simmons	-	Malonato	-
Citrato Christensen	-	Mucato	-
KCN	-	Tartarato de Jordan	-
Urease	+	Acetato de sódio	-
Motilidade - 28°C	-	Maltose	+
Motilidade - 37°C	-	Xilose	-
Lisina descarboxilase	-	Trealose	+
Arginina dihidrolase	-	Cellobiose	+
Ornitina descarboxilase	+	Glicerol-ácido	+
Fenilalanina desaminase	-	Glicerol-gás	+
Glicose-ácido	+	Eritritol	-
Glicose-gás	-	Esculina	-
Lactose	+ 23	Melibiose	-
Sacarose	+	ONPG - 28°C	+
Manitol	+	ONPG - 37°C	+
Dulcitol	-	Oxidase	-

Temperatura de incubação - 37°C, quando não especificada

+ reação positiva dentro de 1 a 2 dias

- reação negativa

+ 11 reação positiva após 11 dias

+ 23 reação positiva após 23 dias

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

** Centro de Estudos "Gomes de Mattos", Clínica Infantil do Ipiranga, Av. Nazaré, 361, São Paulo, SP.

de de Ciências Farmacêuticas, UNESP (Araraquara, SP), revelou que a amostra pertence ao grupo 03. O antibiograma, realizado pelo método descrito por Bauer & col. (Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C. & Turck, M. — Amer. J. Clin. Path. Tech. Sect., 45:493-496, 1966), mostrou que a amostra é sensível a sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, canamicina, gentamicina, polimixina B, sisomicina, ácido nalidíxico, colistina e resiste-

te a penicilina G, céfalotina e ampicilina.

A amostra de *Yersinia enterocolitica* 275 CII/77 parece ser a segunda de origem humana, isolada na América do Sul. O primeiro isolamento foi feito por Pizzolito & col., na cidade de Araraquara, Estado de São Paulo, Brasil, em 1977. (In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, VIII, Rio de Janeiro, 1977. Resumo dos trabalhos. Rio de Janeiro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 1977, p. 74).



DISTRIBUIDORA DE EPCS

São Paulo:
Rua Luiz Góes, 853 — V. Mariana — CEP 04043
Fone: 577-3311

Porto Alegre:
Rua Dr. Flores, 262 — Conjunto 64
Fone: 24-2147

Rio de Janeiro:
Rua da Lapa, 180 — Sala 1106
Fone: 242-8369

DIFCO LABORATORIES

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

SIGMA

Produtos Bioquímicos

TURNER/ESPECTRA

Fotômetros de chama
Espectrofotômetros
Fluômetros

TRANSIDYNE

Densímetros

SHERWOOD

Sistema Monoject,
Aguilhas, Paraplast,
Coagulyzer

THE NUCLEUS

Gamma Counters

HARLECO-S/P

Corantes e aparelhos

S & S

Papel de filtro

BARNSTEAD

Água Deionizada Qualidade Reagente.
Ultrapura

F.T.S.

Liofilizadores

Câmaras

Ultrafria

NATIONAL

Urinômetros, refractômetros

PRODUTOS QUÍMICOS

MCB, Pfaltz & Bauer, Aldrich, USB, Humko,
Pierce, Calbiochem, ICN, Baker, Eastman,
INLAÉ, Fluka.

NUCLEPORE

Membranas filtrantes

PROPPER

Lâminas, lamínulas, Pipetas
glob. brancos e vermelhos

CARTER-WALLACE

Kit de toxoplasma e criptococos

HYCEL

Contadores automáticos de células,
Kits superanalizers

DIGIMETRIC

Balanças eletrônicas.

CLAY ADAMS

Contadores de células, Centrífugas

InLAB (Produção própria)

Bacti-Swabs, Uro-Dips, Lancetas,
Capílares, Agulhas, Detergentes

DRUCKER

Centrífugas refrigeradas

OHAUS

Balanças para laboratórios e indústrias

GENERAL DIAGNOSTIC

Soros controle

Tromboplastina cálcica

CULTURETTES

Transporte de amostras
bacteriológicas

B & L (Bausch & Lomb)

Microscopia

OXFORD

Imunodifusão, Pipetadores,
Diluidores, Kits, Cálculo Urinário,
Bicarbonato, Micropipetas.

WELLCOME

Antígenos e antisoros

PFIZER

Antigex-Hepatitis em 4 minutos

GAS PAK

Jarras e componentes

FLOW LABORATORIES

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

THERMOLYNE

Agitadores, Mufas, Banhos a seco.

DOLES

Kits bioquímicos

CLINILAB

Centrífugas.

LKB

Gamma e Beta Counters

GILFORD

Spectrofotometria de Precisão.

PHARMACIA FINE CHEMICAL

Produtos para Cromatografia e Separações
Bioquímicas

GELMAN

Eletroforese, Membranas filtrantes

LB (Produção nacional)

Meios de cultura em placa, tubos e frascos,
corantes, reagentes, soluções, padrões.

ASSISTÊNCIA TÉCNICA

Conserto e manutenção de aparelhos para
laboratórios. Peças originais.