

Volume 9 Número 4 Out.-Dez. 1978

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

ESMOVIMENTO PARA NÃO
DESENHAR NAG





Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo – Brasil

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

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

Diretores Associados Flávio Alterthum
Instituto de Química — USP
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

Sérgio Olavo P. da Costa
Instituto de Química — USP
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

Assistente de Diretoria Leila Vasconcellos
Sociedade Brasileira de Microbiologia
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Aquisição por não-membros · Assinatura anual para quatro números: Cr\$ 400,00 para o Brasil; US\$ 25.00 (via marítima) ou US\$ 30.00 (via aérea) para o Exterior. Números avulsos: Cr\$ 100,00 para o Brasil e US\$ 7.00 (via aérea) ou US\$ 6.00 (via marítima) para o Exterior. Cheques em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Diretor Executivo da Revista de Microbiologia.

Acquisition by non-members Annual subscription for four numbers: US\$ 25.00 (surface mail) or US\$ 30.00 (air mail). Single copies: US\$ 7.00 (air mail) or US\$ 6.00 (surface mail). Checks for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Director's office.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria Presidente
Wilson Chagas de Araujo
Instituto de Microbiologia UFRJ
Centro de Ciências Médicas
Ilha do Fundão
20000 Rio de Janeiro RJ

Vice-Presidente
João Salvador Furtado
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Secretário Geral
Nelson Jeronymo Lourenço
Faculdade de Ciências Médicas UERJ
Departamento de Micro e Imunologia
R. Teodoro da Silva, 48

Tesoureiro
Milton Mangini
01000 São Paulo SP

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

Instruções aos autores

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

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

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

A Revista segue, essencialmente, o "Style Manual for Biological Journals" (2^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 ($m\mu$) e micromico ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm ; $10^{-6}m$), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm ; $10^{-9}m$), ao invés de milímicro ($m\mu$); e Angstroms (A; $10^{-10}m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro (μ 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 "Bergery'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 somente quando obrigatórias, (ii) o(s) nome(s) do(s) autor(es) com maiúsculas e minúsculas normalmente usadas e (iii) afiliação como nota de rodapé, indicada por asterisco.

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

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 9 Setembro-Dezembro 1978 Número 4

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 9(4)

CONTEÚDO

CONTENTS

Sinval M. de Melo & José Noronha Péres	169	<i>Pseudomonas aeruginosa de origem hospitalar classificadas pela produção de piocina</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa from hospitalar source classified by pyocin production</i>
Maria H.L. dos Reis Waldely de Oliveira Dias & Luiz R. Trabulsi	177	<i>Degradação de tirosina por amostras de enterobactérias e outros microrganismos Gram-negativos: utilidade da prova</i>	<i>Tyrosine degradation by enterobacteria and other Gram-negative microorganisms: the usefulness of the test</i>
Ilvan D. Ricciardi Paulo C. Sabroza E. Daniel Sandoval & W. Mayrink	181	<i>Estudo soro-epidemiológico da prevalência de toxoplasmose humana no Brasil</i>	<i>Seroepidemiological study on the prevalence of human toxoplasmosis in Brazil</i>
José R.F. Brito Ivone R. Suassuna & Italo Suassuna	188	<i>Sensibilidade de <i>Citrobacter diversus</i> (<i>Levinea malonatica</i>) e <i>Levinea amalonatica</i> a antimicrobianos</i>	<i>Susceptibility of <i>Citrobacter diversus</i> (<i>Levinea malonatica</i>) and <i>Levinea amalonatica</i> to antimicrobial agents</i>
Shigehiro Funayama & Glaci T. Zancan	192	<i>Purificação e estudos cinéticos da glucose 6 fosfato desidrogenase de <i>Polyporus circinatus</i></i>	<i>Purification and kinetic studies of glucose 6 phosphate dehydrogenase from <i>Polyporus circinatus</i></i>
Loren G. Giugliano Gerson S. Nakagima Rodolfo Giugliano & Roger Shrimpton	198	<i>Escherichia coli enterotoxigênica isolada de lactentes em Manaus, Amazonas, Brasil</i>	<i>Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> isolated from infants in Manaus, Amazonas, Brasil</i>
Elza A. de Luna & João S. Furtado	202	<i>Pleospora raetica (loculoascomiceto) em cultivo</i>	<i>Pleospora raetica (loculoascomycetes) in culture</i>
Hermann G. Schatzmayr J.A. Zepeda-Bermudez R.M. Ribeiro Nogueira R. Silveira Azeredo & J. Pereira do Nascimento	210	<i>Isolamento do vírus ECHO 9 de casos de meningite asséptica</i>	<i>Isolation of ECHO 9 virus from cases of aseptic meningitis</i>

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Sócios Patrocinadores

BIOLAB-MÉRIEUX — Produtos para Laboratórios Ltda.

Eli Lily do Brasil Ltda.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

Coca-Cola Indústrias Ltda.

Pseudomonas aeruginosa de origem hospitalar classificadas pela produção de piocina*

Sinval Martins de Melo**
& José Noronha Péres**

Resumo

Procedeu-se ao isolamento de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* em quatro serviços hospitalares (Berçário, Clínica Cirúrgica do Aparelho Digestivo, Clínica Urológica e Centro de Tratamento Intensivo) da Faculdade de Medicina da UFMG. O material estudado consistiu de espécimes colhidos de ambientes (ar, pias, torneiras, etc.), alimento desinfetantes, aparelhos, instrumentos e pessoal (médicos, enfermeiras, pacientes e recém-nascidos). A partir desses materiais foram realizados 315 exames, obtendo-se 87 resultados positivos para *Ps. aeruginosa*, que foram identificadas bioquimicamente. Cerca de 240 colônias foram submetidas à tipificação pela prova de produção de piocina, utilizando-se 18 amostras padrão indicadoras. Os resultados obtidos foram os seguintes: 100% das colônias isoladas do Berçário foram tipificadas: 95,6% da Clínica Cirúrgica do Aparelho Digestivo; 50,7% da Clínica Urológica e 42,1% do Centro de Tratamento Intensivo. A *Ps. aeruginosa* de modelo 37 3112 foi predominante no Berçário, tendo sido isolada de diversas fontes e constituiu o tipo infetante endêmico, ao lado de cinco outros tipos diferentes que ocorreram esporadicamente. Sua transmissão aos recém-nascidos se dava diretamente através de mamadeiras ou peras de succão contaminadas. Na Clínica Cirúrgica do Aparelho Digestivo foram isolados nove tipos diferentes, sendo predominante o 62 1231, encontrado nove vezes: no ambiente, mãos e orofaringe de enfermeiras e em pacientes. Na Clínica Urológica, entre as amostras tipificáveis, houve predominio do tipo 42 1414, que foi isolado oito vezes: do ambiente, enfermeiras e pacientes. No Centro de Tratamento Intensivo houve predominância de amostras não tipificáveis.

Summary

Pseudomonas aeruginosa from hospitalar source classified by pyocin production

Isolation of strains of *Pseudomonas aeruginosa* was performed in four wards (the nursery, the surgical clinic of the digestive tract, the urological clinic and the intensive care center) of the Hospital of the Faculdade de Medicina da UFMG. Specimens were collected from the ambient (air, sinks, taps, etc.), food, disinfectants, apparatus, instruments and personnel (doctors, nurses, patients and newborns). From these materials, 315 cultures were done with 87 isolations of *Ps. aeruginosa* that were identified by biochemical tests. About 240 colonies were submitted to typification by the pyocin-production method employing 18 indicator standard strains. Results obtained were: 100% of the colonies isolated from the nursery were typed; 95.6% of those isolated from the surgical clinic; 50.7% of those isolated from the urological clinic and 42.1% of those isolated from the intensive care center. Type 37 3112 of *Ps. aeruginosa* was predominant in the nursery and it was isolated from different ambient sources. Besides this type, five others were encountered sporadically. Transmission of *Ps. aeruginosa* type 37 3112 to newborns occurred via contaminated nursing bottles or syringe. In the surgical clinic of the digestive tract nine different types were isolated and the type 62 1231 was predominant and it was isolated nine times: from the ambient, hands and oropharynx of nurses and from patients. In the urological clinic, type 42 1414 was predominant among the strains that could be typed and it was isolated in eight occasions from the ambient, nurses and patients. In the intensive care center the majority of the strains isolated could not be typed.

* Resumo da Tese de Mestrado (S.M.M.) realizada no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com auxílio do Conselho de Pesquisas da UFMG e BNDE

** Departamento de Microbiologia do ICB da UFMG

Introdução

As infecções hospitalares, como casos esporádicos ou surtos epidêmicos, constituem uma das maiores causas da morbidade e mortalidade entre os pacientes hospitalizados. Elas são conhecidas há mais de um século, desde as observações iniciais de Semmelweis sobre a infecção puerperal. Não sendo um fenômeno novo, e dada a sua freqüência até os nossos dias, muitos profissionais tornam-se complacentes, considerando-as mesmo como inevitáveis. Entretanto, grandes progressos têm sido feitos, principalmente nos aspectos epidemiológicos e de seu controle.

O uso terapêutico das sulfas e dos antibióticos trouxe mudança considerável às relações parasito-hospedeiro e aos padrões de infecções hospitalares caracterizadas por um surpreendente aumento de doenças por estafilococos e bastonetes Gram negativos oportunistas, ao lado de um declínio acentuado das infecções estreptocócicas (12, 30). Ultimamente os bastonetes Gram negativos têm suplantado *Staphylococcus aureus* (25). Entre estes, sobressai pela importância *Ps. aeruginosa*, cuja predominância e agressividade podem ser atribuídas a propriedades como: fácil adaptação às condições ambientais de nutrição, temperatura e umidade (10), patogenicidade devido ao poder invasivo e toxígeno (19, 20), resistência a vários desinfetantes e capacidade de receber e transferir fatores de resistência (21, 29).

As freqüentes solicitações de algumas clínicas hospitalares nos levaram a investigar os tipos de *Ps. aeruginosa* nelas existentes, uma vez que a simples determinação de espécie não basta para estudo epidemiológico das infecções hospitalares de origem bacteriana.

Material e Métodos

Serviços clínicos estudados — Berçário, Clínica Cirúrgica do Aparelho Digestivo, Clínica Urológica e Centro de Tratamento Intensivo (CTI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG.

Espécimes examinados — De outubro de 1973 a setembro de 1974, examinou-se o total de 315 espécimes, obtidos das seguintes fontes: ambientes, alimentos, antissépticos e desinfetantes, aparelhos e instrumentos diversos, pessoal

médico e de enfermagem e pacientes hospitalizados. Amostras de objetos inanimados foram coletadas por meio de zaragatoas umedecidas em soro fisiológico. O ar ambiente foi examinado, expondo-se, durante duas horas, placas de agar acetamida (16). Do pessoal médico e de enfermagem, coletou-se material das mãos, com auxílio de gaze umedecida em soro fisiológico, e do orofaringe, usando-se zaragatoas. Das crianças, colheu-se secreção do orofaringe, com zaragatoas. Dos pacientes, foram obtidos escarros, urina de sonda de demora e dos frascos de volume urinário e ainda pus de feridas cirúrgicas.

Isolamento e identificação das amostras — As amostras foram isoladas, semeando-se os diferentes espécimes diretamente em placas de agar acetamida, ou após enriquecimento em água peptonada, durante uma ou duas semanas. As placas foram incubadas a 37°C e, após 48 horas, transferiam-se as colônias desenvolvidas para tubos de TSI, que eram incubados a 37°C, por 24 horas. Os tubos, com crescimento suspeito de *Pseudomonas*, foram submetidos a exame pelo Gram. Em seguida, as culturas de bastonetes Gram-negativos eram identificadas como *Ps. aeruginosa* pelas provas de: motilidade, produção de indol, reação de citocromoxidase, comportamento no meio de Sellers, utilização oxidativa da D-glicose; oxidação do gluconato a 2-cetogluconato, produção de piocianina, produção de fluoresceína, crescimento em "Pseudosel agar"; crescimento a 42°C, comportamento em agar-leite.

Conservação das amostras isoladas — As amostras foram conservadas em meio de Lignières e em temperatura ambiente, ao abrigo da luz..

Amostras indicadoras — Foram empregadas 18 amostras-padrão selecionadas e descritas por Jones & col. (18), gentilmente cedidas pelo dr. J.J. Farmer III, do "Center for Disease Control", Atlanta, USA.

Produção das piocinas — As piocinas foram obtidas em meio 81, descrito por Jones & col. (17).

Tipificação das amostras — As amostras de *Ps. aeruginosa* isoladas foram tipificadas pelo método desenvolvido por Farmer e seus colegas (8, 9, 17, 18).

Tabela 1 — Piocina-tipificação de amostras de *Ps. aeruginosa* do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG

Serviços	Nº de exames	Nº de isolamentos	Colônias estudadas	Colônias	
				Tipificadas (%)	Não tipificadas (%)
Bercário	116	30 (25,8)	91	91 (100)	0 (0)
Clínica do Aparelho Digestivo	75	16 (21,3)	23	22 (95,6)	1 (4,3)
Clínica Urológica	43	21 (48,8)	69	35 (50,7)	34 (49,2)
Centro de Tratamento Intensivo	81	20 (24,6)	57	24 (42,1)	33 (57,8)
Total	315	87 (27,6)	240	172 (71,6)	68 (28,3)

Resultados

Os resultados gerais, obtidos nos diferentes Serviços do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG, são apresentados na Tabela 1.

Berçário — Dos 315 espécimes de materiais examinados, 116 procederam do Berçário, dos quais 30 foram positivos para *Ps. aeruginosa*. Destes, 91 colônias obtidas foram tipificadas pela produção de piocina (Tabela 1).

Entre os diversos ambientes examinados, nas dependências do Berçário, alguns deles, como ar, banheira, incubadoras e pias, foram positivos para *Ps. aeruginosa*, fornecendo o total de 44 colônias para estudo. Estas foram classificadas em cinco tipos diferentes, mas 35 pertenciam a um mesmo tipo. As amostras colhidas diretamente dos frascos de leite, preparados para abastecer as mamadeiras, foram sempre negativas para *Ps. aeruginosa*. Mas, o mesmo não aconteceu com as amostras colhidas das mamadeiras, prontas para uso das crianças. Estas se achavam contaminadas com o tipo de *Ps. aeruginosa*: 37 3112.

Soluções desinfetantes à base de tetraborato de sódio, em uso para a esterilização de sondas gástricas, mostraram-se sempre estéreis, quando examinadas. Entretanto, soluções de hipoclorito de sódio ("Milton"), em uso com mamadeiras, bicos e peras, foram positivas para o mesmo tipo de *Ps. aeruginosa* isolados das mamadeiras. Espécimes colhidos das mãos e do orofaringe de três médicos e oito enfermeiras foram negativos para *Ps. aeruginosa*, mas uma estagiária, estudante de enfermagem, apresentou esta bactéria no orofaringe.

De 31 recém-nascidos, assintomáticos, em que se examinou material do orofaringe, 15 apresentaram culturas positivas para o tipo 37 3112 de *Ps. aeruginosa*, sendo o orofaringe, de um deles, colonizado também por outro ti-

po. E, ainda, de uma criança com diarréia, isolou-se o tipo 37 3112, das fezes.

Das 91 colônias tipificadas, 81 apresentaram o modelo de produção de piocina 37 3112 e as outras dez, cinco modelos diferentes. A de modelo 37 3112 estava presente em todos os tipos de fontes positivas de *Ps. aeruginosa* (Tabela 2). Ela só não foi encontrada numa das pias, colonizada pelo tipo 61 1111.

Tabela 2 — Distribuição dos tipos de *Ps. aeruginosa* isolados do berçário do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG, segundo as fontes

Fonte	Nº de colônias examinadas		Tipo
Ar	4	3	37 3112
		1	64 7577
Banheira	9		37 3112
Incubadoras (Água)	11	10	37 3112
		1	66 1271
Pias	20	13	37 3112
		5	61 1111
		2	62 1231
Alimento (Mamadeira)	9		37 3112
Desinfetante ("Milton")	5		37 3112
Enfermeira	1		37 3112
Recém-nascidos	32	31	37 3112
		1	62 1614

Clínica cirúrgica do aparelho digestivo — Dos 75 espécimes examinados nessa clínica, 16 foram positivos para *Ps. aeruginosa*. Estes forneceram 23 colônias, das quais 22 foram tipificáveis (Tabela 1). Das pias de duas enfermarias e da sala de enfermagem, foram isolados quatro tipos diferentes de *Ps. aeruginosa*. Dos oito médicos examinados, não se isolou *Ps. aeruginosa*; porém, de cinco das 17 enfermeiras,

isolaram-se amostras pertencentes a quatro modelos diferentes de produção de piocina. Um destes foi isolado das mãos de duas enfermeiras e do orofaringe de outra, enquanto os demais achavam-se nas mãos de três outras enfermeiras. Amostras de urina, de 24 horas, de 18 pacientes, e pus de feridas cirúrgicas de seis outros forneceram quatro exames positivos entre os primeiros e três, entre os últimos, para *Ps. aeruginosa*. A distribuição dos tipos de *Ps. aeruginosa*, encontrados nessa Clínica, segundo suas fontes de isolamento, é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3 — Distribuição dos tipos de *Ps. aeruginosa* isolados da Clínica Cirúrgica do Aparelho Digestivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG, segundo as fontes

Fonte	Nº de colônias examinadas	Tipo
Pias	1	42 1724
	1	62 1231
	4	62 7864
	1	82 8888
Enfermeiras — Mão	1	11 1114
	2	12 1426
	6	62 1231
	2	62 4444
	1	
— Orofaringe	1	62 1231
Pacientes — Urina 24hs	6	62 1231
	5	
	1	62 4414
— Ferida Ci- rúrgica	6	62 1231
	5	
	1	não tipificável

Clínica urológica — De 43 espécimes de materiais examinados, procedentes da Clínica Urológica, 21 deram culturas positivas para *Ps. aeruginosa*. Destas, foram isoladas 69 colônias, das quais 35 foram tipificáveis (Tabela 1). Dos ambientes examinados na Clínica Urológica, *Ps. aeruginosa* foi isolada de quatro pias e três torneiras. A classificação de 19 colônias, destes exames, permitiu identificar cinco tipos diferentes, ao lado de seis colônias não tipificáveis. *Ps. aeruginosa* foi isolada das mãos de cinco enfermeiros e do orofaringe de dois outros, enquanto os exames feitos em três médicos foram negativos. De nove amostras de urina examinadas, pertencentes a nove pacientes com sonda de demora, *Ps. aeruginosa* foi isolada de seis delas. De uma solução de tetraborato de sódio contendo catéteres estéreis para uso, foi isolada

da *Ps. aeruginosa* e um fungo anemófilo, de micélio estéril.

A distribuição dos tipos de *Ps. aeruginosa*, encontrados na Clínica Urológica, segundo suas fontes de isolamento, é mostrada na Tabela 4.

Tabela 4 — Distribuição dos tipos de *Ps. aeruginosa* isolados da Clínica Urológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG, segundo as fontes

Fonte	Nº de colônias examinadas	Tipo
Pias	1	37 3122
	1	38 3126
	13	42 1414
	3	62 6414
	4	não tipificável
Torneiras	7	42 1414
	1	88 8788
	2	não tipificável
Desinfetante (Tetraborato de sódio)	5	não tipificável
Enfermeiros — Mão	3	42 1414
	8	61 2631
	1	não tipificável
— Orofaringe	4	
	3	41 1131
	1	não tipificável
Pacientes — Urina	2	
	30	41 1131
	5	42 1414
	5	84 8816
	17	não tipificável

Centro de tratamento intensivo — De 81 espécimes oriundos de fontes diversas do CTI, 20 foram positivos para *Ps. aeruginosa*. Destes, foram isolados 57 colônias, das quais apenas 24 foram tipificáveis pela produção de piocina, como é mostrado na Tabela 1.

Dos ambientes examinados, *Ps. aeruginosa* foi isolada de cinco pias e uma torneira, no total de 26 colônias. Destas, 15 foram tipificáveis, sendo que 10 delas pertencem ao tipo 88 8878. A pia de uma das enfermarias foi examinada três vezes, em um período de 10 meses, fornecendo, em todos os exames, culturas de *Ps. aeruginosa* não tipificáveis.

Do ar das enfermarias, não se isolou *Ps. aeruginosa* após a exposição de nove placas de agar acetamida. Os respiradores, antes de serem usados, não forneceram culturas positivas. Após o seu uso, as secreções colhidas do inte-

Tabela 5 — Distribuição dos tipos de *Ps. aeruginosa* isolados do Centro de Tratamento Intensivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG, segundo as fontes

Fonte	Nº de colônias	Tipo
Pias	20	66 1273
		88 8578
		88 8878
		não tipificável
Torneiras	6	88 8878
Enfermeiras — Mãos	7	66 1586
		88 6888
		não tipificável
— Oorfaringe	1	não tipificável
Pacientes — Escarro	23	87 8588
		não tipificável
	4	
	19	

rior dos tubos figuram neste trabalho como material de pacientes (escarro). Espécimes de materiais obtidos de sete médicos foram negativos, enquanto, de quinze enfermeiras examinadas, *Ps. aeruginosa* foi isolada das mãos de quatro delas e do orofaringe de uma. *Ps. aeruginosa* foi isolada de escarros de sete pacientes, entre 14 examinados, tendo sido estudadas 23 colônias, das quais apenas quatro foram tipificadas.

A distribuição de tipos de *Ps. aeruginosa* encontrados no CTI, segundo suas fontes de isolamento, pode ser vista na Tabela 5.

Distribuição dos tipos de Ps. aeruginosa — A Tabela 6 mostra os tipos de *Ps. aeruginosa* isolados nas quatro Clínicas, bem como suas fontes de origem e o número dessas para cada tipo encontrado.

Tabela 6 — Tipos de *Ps. aeruginosa* encontrados em quatro serviços do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG, segundo a natureza e o número de fontes positivas

Clinica	Fonte	Ambiente	Mamadeira e desinf.	Enfermeiros	Recém nascidos	Pacientes	
Clinica	Tipo	Ar Banheira Incubadora Pia Torneira	Mamadeira Desinfetante	Mão Orofaringe	Orofaringe Fezes	Ferida cirúrg. Urina Escarro	Total
Bercário	37 3112 61 1111 62 1231 62 1614 64 7577 66 1271	2 ^a 1 2 4 1 1	1 1	1	15 1 1		28 1 1 1 1 1
Clinica Cirúrgica do Aparelho Digestivo	11 1114 12 1426 42 1724 62 1231 62 4414 62 4444 62 7864 82 8888 Não tip.	1 1 1 1		1 2 1 1	2 3 1 1		1 1 1 9 1 1 1 1
Clinica Urológica	37 3112 38 3126 41 1131 42 1414 61 2631 62 6414 84 8816 88 8788 Não tip.	1 1 2 2 1 1 3 1 3 1		1 3 1 2 2	1 1 4		1 1 2 8 1 1 1 1 13
C.T.I.	66 1273 66 1586 87 8588 88 6888 88 8578 88 8878 Não tip.	1 1 1 1 1 3		1 1 2 1		1 1 1 6	1 1 1 2 12

^a — Os números se referem à quantidade de fontes positivas

Discussão

A classificação de amostras de *Ps. aeruginosa*, inicialmente feita por soro-tipificação (22), pela associação de soro e fagotipagem (14, 24), foi logo acrescida da piocina-tipificação, que tem sido empregada com sucesso. Assim, amostras mucoides e não mucoides, de um mesmo paciente com fibrose cística, mostraram pertencer ao mesmo tipo piocínico (35). A piocina-tipificação tem se revelado bom marcador epidemiológico (5, 13). Com seu emprego, tem sido possível esclarecer a origem e o modo de transmissão de *Ps. aeruginosa* na infecção hospitalar (2, 5, 7, 11, 15, 27, 33).

Berçário — A maior freqüência de amostras pertencentes a um único modelo de produção de piocina (Tabela 2), em relação às outras ocasionalmente encontradas, é um fato relatado por Wahba (34), que observou o predomínio de tipos em enfermarias de pacientes muito suscetíveis à infecção, como é o caso dos recém-nascidos.

A contaminação do desinfetante "Milton" pelo tipo 37 3112 deve ter sido em consequência de matéria redutora presente nos bicos, mamadeiras e principalmente no interior das peras de borracha que se achavam nas mesmas soluções; pois a eficiência desse desinfetante requer escrupulosa limpeza do material a ser desinfetado. Quando esse detalhe não é observado, a matéria orgânica presente reduz o teor de cloro em uso e, em consequência disso, a solução perde sua ação antimicrobiana; como tem acontecido (1, 32).

Teres & col. (31) apontaram as pias colonizadas por *Ps. aeruginosa*, como fonte de contaminação de mãos de enfermeiras. Embora as pias e a banheira se achassem colonizadas por *Ps. aeruginosa*, as enfermeiras do berçário, em nenhuma ocasião, apresentaram exames positivos de material colhido das mãos, para esta bactéria. Edmonds & col. (6) atribuíram às pias contaminadas papel relevante na transmissão desta bactéria aos doentes com queimadura através do espalhamento de gotículas. Portanto, a presença do tipo 37 3112 no ar pode ser explicada pela formação de aerosol pelo espalhamento de água das pias.

Os dados obtidos no Berçário permitem apontar as mamadeiras e as peras de sucção como veículos de transmissão de *Ps. aeruginosa*, de modelo 37 3112, às crianças.

Clinica cirúrgica do aparelho digestivo — Das quatro amostras de *Ps. aeruginosa* isoladas de ambiente (pias), somente a de modelo de produção de piocina 62 1231, isolada da pia da enfermaria de mulheres, apareceu também no pessoal. Esse tipo foi isolado: das mãos de duas enfermeiras, do orofaringe de uma enfermeira, da urina de 24 horas de três pacientes e da ferida cirúrgica de dois pacientes (Tabela 6). Portanto, esse tipo, isolado de todas as fontes positivas para *Ps. aeruginosa* (Tabela 3), merece atenção especial, em relação aos outros oito, isolados de uma única vez.

A presença de *Ps. aeruginosa* de modelo de produção de piocina 62 1231, em urina de 24 horas, mãos de enfermeiras e ferida cirúrgica, sugere a provável cadeia de transmissão, pois, como observou McLeod (24), *Ps. aeruginosa* persiste nos frascos de urina de 24 horas, de onde parte a contaminação através das mãos do pessoal de enfermagem.

Clinica urológica — Entre as amostras tipificáveis de *Ps. aeruginosa*, procedentes da Clínica Urológica (Tabela 4), destaca-se a de modelo de produção de piocina 42 1414, que foi isolada de torneiras e pias das enfermarias, mãos de três enfermeiras e urina de um paciente. A importância da colonização de torneiras por *Ps. aeruginosa*, tem sido enfatizada por Constable & Thompson (4). A amostra de modelo 41 1131 foi isolada do orofaringe de uma enfermeira e da urina de um paciente. As outras amostras tipificáveis ocorreram esporadicamente nos espécimes examinados.

O baixo percentual (50.7%) de colônias tipificáveis pela produção de piocina permite pensar na ocorrência de tipos predominantes entre as não tipificadas. Além disso, colônias não produtoras de piocina foram isoladas de uma solução de tetraborato de sódio com cateteres considerados estéreis para uso. Fatos como este, de insucesso com a desinfecção química, têm sido apontados como causas de transmissão de infecções por *Ps. aeruginosa* (3, 26, 33).

Centro de tratamento intensivo — O método de tipificação pela produção de piocina só permitiu classificar 42,1% das amostras isoladas no CTI (Tabela 1) e as amostras tipificadas parecem não desempenhar papel importante nas infecções, porque foram encontradas ocasionalmente, em alguns espécimes examinados (Tabela 5). Dos sete pacientes com exames positi-

vos para *Ps. aeruginosa*, apenas um apresentou amostra tipificável pelo método usado, cujo tipo, 87 8588, não foi isolado de outra fonte (Tabela 5). Talvez este tipo tenha sido trazido pelo próprio paciente, justificando, assim, uma hipótese de Morehead & Houck (26), a respeito da introdução da *Ps. aeruginosa* nos centros de tratamentos intensivos.

Teres & col. (31) estudando a ocorrência de infecções por *Ps. aeruginosa*, em centro de tratamento intensivo, no período de 19 meses, conseguiram tipificar, pela produção de piocina, 75% das amostras isoladas de pacientes. Dois dos tipos isolados foram considerados amostras "residentes". Enquanto Lowbury & col. (23), empregando a fago e soro-tipificação, foram capazes de identificar a maioria das amostras de *Ps. aeruginosa* isoladas num período de 20 meses, em centro de tratamento intensivo. Ao longo do estudo, ocorreram oito surtos de infecção, dos quais foram isolados 18 tipos diferentes. Os tipos variavam muito, de um surto para outro, não havendo amostras endêmicas nos pacientes.

O baixo percentual (42,1%) de amostras tipificáveis no CTI, no nosso entender, não deve ser interpretado como pouca sensibilidade do método empregado, pois o estudo se fez num curto prazo e pode ter ocorrido até a existência de um tipo endêmico predominante, não tipificável, durante o período das coletas dos espécimes.

O não isolamento de *Ps. aeruginosa* do ar, nas enfermarias do CTI, está de acordo com Pruitt (28), que considera esta bactéria como "poor air traveler".

Distribuição dos tipos de Ps. aeruginosa — Os tipos 37 3112 (do berçário), 62 1231 (da CCAD) e 42 1414 (da Clínica Urológica) foram encontrados em diversas fontes ambientais e se repetiram com bastante freqüência em espécimes colhidos de pessoal, o que lhes confere a característica de "infetantes". Por outro lado, vários tipos isolados de ambientes, principalmente de pias, não o foram de espécimes de pessoal, os quais podem ser considerados como tipos ambientais.

Referências Bibliográficas

- Ayliffe, G.A.J.; Collins, B.J. & Pettit, F. — Contamination of infants feeds in a Milton Milk Kitchen. Lancet, 1: 559-560, 1970.
- Ayliffe, G.A.J.; Lowbury, E.J.L.; Hamilton, J.G.; Small, J.M.; Asheshov, E.A. & Parker, M.T. — Hospital infection with *Pseudomonas aeruginosa* in neurosurgery. Lancet, 2:365-368, 1965.
- Burdon, D.W. & Whitby, J.L. — Contamination of hospital disinfectants with *Pseudomonas species*. Brit. Med. J., 2:153-155, 1967.
- Constable, F.L. & Thompson, M.W. — *Pseudomonas aeruginosa* in hospital. Lancet, 1:721-723, 1973.
- Deighton, M.A.; Tagg, J.R. & Mushin, R. — Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in hospitals. 2. "Fingerprinting" of *Ps. aeruginosa* strains in a study of cross-infection in a children's hospital. Med. J. Australia, 1:892-896, 1971.
- Edmonds, P.; Suskind, R.R.; Macmillan, B.G. & Holder, I.A. — Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in a burns hospital: Surveillance by a combined typing system. Appl. Microbiol., 24:219-225, 1972.
- Falcão, D.P.; Mendonça, C.P.; Scrassolo, A.; Almeida, B.B.; Hart, L.; Farmer L.H. & Farmer III, J.J. — Nursery outbreak of severe diarrhea due to multiple strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Lancet, 2:38-40, 1972.
- Farmer III, J.J. — Mnemonic for reporting bacteriocin and bacteriophage types. Lancet, 2:96, 1970.
- Farmer III, J.J. & Herman, L.G. — Epidemiological fin-gerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* by the production of and sensitivity to pyocin and bacteriophage. Appl. Microbiol., 18:760-765, 1969.
- Favero, M.S.; Carson, L.A.; Bond, W.W. & Petersen, N.J. — *Pseudomonas aeruginosa*: Growth in distilled water from hospitals. Science, 173:836-838, 1971.
- Fierer, J.; Taylor, P.M. & Gezon, H.M. — *Pseudomonas aeruginosa* epidemic traced to delivery-room resuscitators. New Engl. J. Med., 276:991-996, 1967.
- Finland, M.; Jones, W.F. & Barnes, M.W. — Occurrences of serious bacterial infections since the introduction of antibacterial agents. J. Amer. Med. Assoc., 170:2188-2197, 1959.
- Gillies, R.R. & Govan, J.R.W. — Typing of *Pseudomonas pyocyannea* by pyocine production. J. Path. Bacteriol., 91:339-345, 1966.
- Gould, J.C. & McLeod, J.W. — A study of the use of agglutinating sera and phage lysis in the classification of strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Path. Bacteriol., 79:295-311, 1960.
- Heckman, M.G.; Babcock, J.B. & Rose, H.D. — Pyocine Typing of *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical and epidemiologic aspects. Amer. J. Clin. Path., 57:35-42, 1972.
- Hedberg, M. — Acetamide agar medium selective for *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol., 17:481, 1969.
- Jones, L.F.; Pinto, B.V.; Thomas, E.T. & Farmer III, J.J. — Simplified method for producing pyocins from *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol., 26:120-121, 1973.
- Jones, L.F.; Zakanyicz, J.P.; Thomas, E.T. & Farmer III, J.J. — Pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa*: a simplified method. Appl. Microbiol., 27:400-406, 1974.

19. Liu, P.V. — Factors that influence toxicogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 88:1421-1427, 1964.
20. Liu, P.V.; Yoshii, S. & Hsieh, H. — Exotoxins of *Pseudomonas aeruginosa*. II — Concentration, purification and characterization of exotoxin A. *J. Infect. Dis.*, 128: 514-519, 1973.
21. Lowbury, E.J.L.; Babb, J.R. & Roe, E. — Clearance from a hospital of Gram-negative bacilli that transfer carbenicillin-resistance to *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*, 2:941-945, 1972.
22. Lowbury, E.J.L. & Fox, J. — The epidemiology of infection with *Pseudomonas pyocyanea* in a burns unit. *J. Hyg.*, 52:403-416, 1954.
23. Lowbury, E.J.L.; Thom, B.T.; Lilly, H.A.; Babb, J.R. & Whittall, K. — Sources of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with tracheostomy. *J. Med. Microbiol.*, 3:39-56, 1970.
24. McLeod, J.W. — The hospital urine bottle and bedpan as reservoirs of infection by *Pseudomonas pyocyanea*. *Lancet*, 1:394-397, 1958.
25. McNamara, M.J.; Hill, M.C.; Balows, A. & Tucker, E.B. — A study of bacteriologic patterns of hospital infection. *Ann. Inter. Med.*, 66:480-488, 1967.
26. Morehead, C.D. & Houck, P.W. — Epidemiology of *Pseudomonas* infections in a pediatric intensive care unit. *Amer. J. Dis. Child.*, 124:564-570, 1972.
27. Phillips, I. — *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infections in patients receiving mechanical ventilation. *J. Hyg. Camb.*, 65:229-235, 1967.
28. Pruitt Jr., B.A. — Infections caused by *Pseudomonas species* in patients with burns and in other surgical patients. *J. Infect. Dis.* (Suppl), 130:S8-S13, 1974.
29. Roe, E.; Jones, R.J. & Lowbury, E.J.C. — Transfer of antibiotic resistance between *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and other Gram-negative bacilli in burns. *Lancet*, 1:149-152, 1971.
30. Rogers, D.E. — The changing pattern of life-threatening microbial disease. *New Engl. J. Med.*, 261:677-683, 1959.
31. Teres, D.; Schweers, P.; Bushnell, L.S.; Whyte, J.H. & Feingold, D.D. — Sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a respiratory-surgical intensive therapy unit. *Lancet*, 1:415-417, 1973.
32. Thom, A.R.; Cole, A.P. & Watrasiewicz, K. — *Pseudomonas aeruginosa* infection in a neonatal nursery, possibly transmitted by a breast-milk pump. *Lancet*, 1:560-561, 1970.
33. Tinne, J.E.; Gordon, A.M.; Bain, W.H. & Mackey, W.A. — Cross-infection by *Pseudomonas aeruginosa* as a hazard of intensive surgery. *Brit. Med. J.*, 4:313-315, 1967.
34. Wahaba, A.H. — Hospital infection with *Pseudomonas pyocyanea*: an investigation by a combined pyocine and serological typing method. *Brit. Med. J.*, 1:86-89, 1965.
35. Williams, R.J. & Govan, J.R.W. — Pyocine typing of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol.*, 6:409-412, 1973.

**Degradação de tirosina
por amostras de enterobactérias
e outros microrganismos
Gram-negativos: utilidade da prova**

Maria Henriqueta L. dos Reis*
Waldely de Oliveira Dias
& Luiz Rachid Trabulsi

Resumo

Foi estudada a utilização da tirosina por 1388 amostras de enterobactérias e outros microrganismos Gram-negativos. O aminoácido foi degradado por amostras dos gêneros *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas* e *Aeromonas*. Utilizaram a tirosina, em 24 horas, 264 amostras (100,0%) dos gêneros *Proteus* e *Providencia*, 35 amostras (70,0%) de *Citrobacter freundii* H₂S⁺ indol⁻, uma amostra de *C. freundii* H₂S⁻ indol⁻ e as duas amostras de *Citrobacter diversus* testadas. O teste foi positivo, em 48-72 horas, com 10 amostras (20,0%) de *C. freundii* H₂S⁺ indol⁻ e nove amostras (23,7%) de *Serratia marcescens*. No gênero *Pseudomonas*, sete amostras (6,0%) utilizaram a tirosina em 24 horas e 65 amostras (55,5%) em 48-72 horas. Duas, de três amostras de *Aeromonas*, foram tirosina positiva em 48-72 horas. O teste mostrou-se, conforme citado na literatura, de igual valor que a fenilalanina desaminase, na identificação de *Proteus* e *Providencia*, podendo, eventualmente, ser utilizado como prova adicional na identificação de amostras de *Citrobacter* e *Pseudomonas*.

Summary

Tyrosine degradation by enterobacteria and other Gram-negative microorganisms: the usefulness of the test

The use of tyrosine by 1,388 strains of enterobacteria and other gram-negative microorganisms was studied. The amino acid was utilized by strains of *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas* and *Aeromonas*. All 264 strains (100.0%) of *Proteus* and *Providencia*, 35 strains (70.0%) of *Citrobacter freundii* H₂S⁺ indol⁻, one strain of *C. freundii* H₂S⁻ indol⁻ and the two tested strains of *Citrobacter diversus* gave a positive tyrosine reaction in 24 hours; 10 strains (20.0%) of *C. freundii* H₂S⁺ indol⁻ and nine strains (23.7%) of *Serratia marcescens* showed a delayed positive reaction. The tyrosine was utilized, in 24 hours, by seven strains (6.0%) of *Pseudomonas* and in 48-72 hours by 65 (55.5%) of these strains. Two strains of *Aeromonas*, among the three studied, were tyrosine positive in 48-72 hours. The results indicate that the tyrosine medium is of value in identifying the *Proteus* — *Providencia* group and may be useful as an additional test to identify *Citrobacter* and *Pseudomonas* strains.

Introdução

Devido à grande incidência de enterobactérias atípicas isoladas de material clínico (6, 7), torna-se necessário o emprego de novos testes que contribuam para a identificação dessas amostras.

O meio de tirosina, descrito em 1955 (4), foi empregado, a princípio, na caracterização de

Actinomyces aeróbios (4, 5). Mais recentemente, foi verificado que este meio poderia ser utilizado, também, na diferenciação de enterobactérias (7).

O presente trabalho tem como objetivos confirmar os dados já existentes na literatura e ampliar os estudos para outros microrganismos Gram-negativos.

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

Material e Métodos

Amostras — Foram estudadas 1388 amostras de enterobactérias e outros microrganismos Gram-negativos. Oitocentas e trinta e seis amostras foram isoladas em nosso laboratório, em 1977, a partir de fezes de crianças diarréicas e normais e 552 foram obtidas de vários materiais clínicos, fazendo parte da bacterioteca do laboratório. As amostras estudadas constam da Tabela 1. Sua identificação foi feita pelas provas recomendadas por Edwards & Ewing (1) ou pelo sistema API 20-E (Analytab Products, Inc., Plainview, N.Y.), quando necessário.

Tabela 1 — Enterobactérias e outros microrganismos Gram-negativos estudados no teste de degradação de tirosina

Microrganismos	Nº de amostras testadas
<i>Escherichia coli</i>	375
<i>Shigella flexneri</i>	53
<i>S. sonnei</i>	35
<i>S. dysenteriae</i>	20
<i>S. boydii</i>	10
<i>Edwardsiella tarda</i>	4
<i>Salmonella typhimurium</i>	42
<i>S. anatum</i>	15
<i>S. derby</i>	18
<i>S. newport</i>	11
<i>S. typhi</i>	12
<i>S. sp</i>	25
<i>Arizona hinshawii</i>	17
<i>Citrobacter freundii</i> H ₂ S ⁺ indol ⁻	50
<i>C. freundii</i> H ₂ S ⁻ indol ⁺	3
<i>C. freundii</i> H ₂ S ⁻ indol ⁻	6
<i>Citrobacter diversus</i>	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	138
<i>Enterobacter hafniae</i>	1
<i>E. cloacae</i>	94
<i>E. aerogenes</i>	9
<i>E. agglomerans</i>	6
<i>E. sp</i>	4
<i>Serratia marcescens</i>	33
<i>S. liquefaciens</i>	5
<i>Proteus mirabilis</i>	87
<i>P. vulgaris</i>	15
<i>P. morganii</i>	90
<i>P. rettgeri</i>	34
<i>Providencia alcalifaciens</i>	31
<i>P. stuartii</i>	7
<i>Yersinia enterocolitica</i>	10
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	6
<i>Pseudomonas sp</i>	117
<i>Aeromonas sp</i>	3
Total	1.388

Meio de tirosina — O meio de tirosina utilizado foi o descrito por Sheth & Kurup (7). Quatro gramas de L-tirosina (Sigma) foram adiciona-

dos a 1000ml de agar-triptona (Oxoid) e autoclavados a 120°C, durante 15 minutos. O meio foi distribuído em placas de Petri estéreis, tomando-se o cuidado de espalhar uniformemente os cristais de tirosina, que não são completamente solúveis. As placas, conservadas em geladeira, foram utilizadas no período máximo de três semanas.

Método — A metodologia utilizada foi a descrita por Sheth & Kurup (7), modificada. Placas contendo o meio de tirosina foram divididas em cinco partes iguais, nas quais foram semeadas duas amostras-controle (uma que não utiliza a tirosina, e outra que degrada o aminoácido) e três amostras a serem estudadas. A semeadura foi feita com uma alça de níquel-cromo, a partir de culturas crescidas 24 horas em agar nutritivo inclinado, tendo o inóculo o diâmetro aproximado de 6-10mm. As leituras foram feitas a cada 24 horas, por um período de incubação de 72 horas. As amostras de *Yersinia* foram incubadas a 28°C e as demais a 37°C. A prova foi considerada positiva quando a decomposição da tirosina pela bactéria levou ao aparecimento de um halo claro ao redor do inóculo, em 24 horas. O aparecimento de qualquer clareamento do meio, ao redor do inóculo, após 48 horas, foi considerado como prova positiva tardia. Na ausência de qualquer halo e em presença de crescimento adequado da amostra, a prova foi considerada negativa.

Resultados

Experimentos preliminares, realizados com o intuito de avaliar as modificações introduzidas na metodologia utilizada, revelaram que os resultados eram os mesmos quando a inoculação em meio de tirosina era feita a partir de colônia isolada ou a partir do crescimento das amostras em agar nutritivo inclinado. Os halos de decomposição de tirosina, de uma amostra positiva, tinham aproximadamente o mesmo diâmetro, quando se utilizava qualquer um dos inóculos e para a amostra tirosina-negativa não havia aparecimento de halo.

Das 1388 amostras testadas, 310 (22,3%) degradaram a tirosina em 24 horas; 86 (6,2%) apresentaram prova positiva tardia e as demais prova negativa. As amostras que apresentaram prova positiva ou positiva tardia pertencem aos gêneros *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas* e *Aeromonas* (Tabela 2).

Tabela 2 — Degradação de tirosina por 1388 amostras de enterobactérias e outros microrganismos Gram-negativos

Gênero	Nº de amostras testadas	Teste Positivo em 24hs		Teste Positivo em 48-72hs	
		Nº	%	Nº	%
<i>Escherichia</i>	375	0	0	0	0
<i>Shigella</i>	118	0	0	0	0
<i>Edwardsiella</i>	4	0	0	0	0
<i>Salmonella</i>	123	0	0	0	0
<i>Arizona</i>	17	0	0	0	0
<i>Citrobacter</i>	61	38	62,3	10	16,4
<i>Klebsiella</i>	138	0	0	0	0
<i>Enterobacter</i>	114	0	0	0	0
<i>Serratia</i>	38	0	0	9	23,7
<i>Proteus</i>	226	226	100,0	0	0
<i>Providencia</i>	38	38	100,0	0	0
<i>Yersinia</i>	16	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	117	7	6,0	65	55,5
<i>Aeromonas</i>	3	0	0	2	66,7
Total	1388	310	22,3	86	6,2

Tabela 3 — Degradação de tirosina por 61 amostras de *Citrobacter*

Microrganismo	Nº de amostras testadas	Teste Positivo em 24hs		Teste Positivo em 48-72hs	
		Nº	%	Nº	%
<i>Citrobacter freundii</i> H ₂ S ⁺ indol ⁻	50	35	70,0	10	20,0
<i>C. freundii</i> H ₂ S ⁻ indol ⁻	6	1	16,7	0	0
<i>C. freundii</i> H ₂ S ⁻ indol ⁺	3	0	0	0	0
<i>Citrobacter diversus</i>	2	2	100,0	0	0

Entre 61 amostras de *Citrobacter*, 38 degradaram a tirosina em 24 horas e 10 em 48-72 horas. Das 50 amostras de *Citrobacter freundii* H₂S⁺ indol⁻, 35 (70,0%) foram tirosina-positiva em 24 horas e 10 (20,0%) positivas tardias. As amostras de *C. freundii* H₂S⁻ indol⁺ não degradaram a tirosina, enquanto que uma amostra de *C. freundii* H₂S⁻ indol⁻ degradou o aminoácido em 24 horas. As duas amostras de *Citrobacter diversus* foram tirosina-positiva em 24 horas (Tabela 3). Dentre as 38 amostras de *Serratia*, apenas nove amostras de *Serratia marcescens* degradaram a tirosina tardivamente. As 264 amostras (100%) pertencentes aos gêneros *Proteus* e *Providencia* foram tirosina-positiva em 24 horas, enquanto que nos gêneros *Escherichia*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Arizona*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Yersinia*, não se obteve prova positiva em qualquer das amostras (Tabela 2). Das 117 amostras de

Pseudomonas testadas, 7 (6,0%) degradaram a tirosina em 24 horas e 65 (55,5%) apresentaram prova positiva tardia. Duas das três amostras de *Aeromonas* foram positivas tardivamente.

Discussão

Os resultados obtidos pelo teste de degradação da tirosina mostraram a grande utilidade do meio na triagem do grupo *Proteus-Providencia*, que apresentou prova positiva em 24 horas, em 100% das amostras, enquanto que todas as amostras de *Escherichia*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Arizona*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Yersinia* foram invariavelmente negativas. Estes resultados confirmam outros anteriormente descritos na literatura em que o teste mostrou-se de valor semelhante ao da fenilalanina desaminase, já tendo sido descrita uma amostra de *Proteus morganii* que não desami-

mou a fenilalanina e apresentou o teste de tirosina positivo (7). Foi relatado também o seu valor adicional na identificação de amostras atípicas de *Enterobacter agglomerans*, fenilalanina-positiva, que não degradam a tirosina, podendo ser diferenciadas do gênero *Providencia* (7).

C. diversus, uma espécie de *Citrobacter* caracterizada por não apresentar formação de H₂S e apresentar formação de indol (3), tem sido isolada de material clínico com relativa freqüência (6, 7). Embora ainda não se saiba ao certo seu papel como agente patogênico primário, aceita-se seu envolvimento em infecções secundárias e hospitalares (8). Assim sendo, torna-se necessária sua identificação rápida e segura no laboratório clínico.

C. freundii pode apresentar formação de H₂S e não formar indol, sendo esta sua forma típica mais freqüente; pode ainda não formar H₂S e indol, ou não formar H₂S e formar indol (2). No último caso, torna-se difícil sua diferenciação de *C. diversus*. Sabe-se que estas bactérias podem ser diferenciadas por provas de KCN e adonitol: o *C. diversus* é KCN-negativo e adonitol-positivo e o *C. freundii*, típico e atípico, KCN-positivo e adonitol-negativo. No presente trabalho, nenhuma amostra de *C. freundii* H₂S-indol⁺ degradou a tirosina, enquanto que as duas amostras de *C. diversus* apresentaram prova positiva, em 24 horas. As amostras de *C. diversus* descritas na literatura (7) também apresentaram prova de tirosina-positiva, em 24

horas, em 100% dos casos. Isto torna o teste mais prático, em relação à prova de KCN, por ser mais rápido e permitir leitura mais fácil e sem margem para dúvidas. O teste poderia, neste caso, ser utilizado com segurança, juntamente com a prova de adonitol.

Embora a amostragem de *Citrobacter* seja baixa, os resultados obtidos concordam com os da literatura (7), no que diz respeito à utilização do meio de tirosina na identificação de *C. diversus*, diferenciando-o, de maneira segura, de *C. freundii* H₂S-indol⁺ e de *E. coli* lisina-negativa (7).

Foram obtidas provas positivas tardias em nove amostras de *S. marcescens*, entre as 38 amostras de *Serratia* testadas, fato este que não está de acordo com Sheth & Kurup (7), que não obtiveram prova positiva para nenhuma das 49 amostras de *Serratia* estudadas. Estes resultados podem estar ligados, talvez, à origem das amostras, variável que não foi estudada no presente trabalho.

Pelos dados obtidos, o teste parece ser de utilidade também na identificação de bactérias do gênero *Pseudomonas*, no qual foi encontrada uma porcentagem de positividade relativamente alta (61,5%), considerando-se as reações positivas e positivas tardias.

Quanto ao fato do teste ser ou não de utilidade na identificação de *Aeromonas*, nossos resultados não são conclusivos, devido ao pequeno número de amostras estudadas.

Referências Bibliográficas

1. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. — Identification of *Enterobacteriaceae*. 3rd ed. Minneapolis, Burgess, 1972.
2. Ewing, W.H. — Biochemical characterization: *Citrobacter freundii* and *Citrobacter diversus*. Atlanta, Public Health Service, 1976. (DHEW publication n° (CDC) 76-8283).
3. Ewing, W.H. & Davis, B.R. — Biochemical characterization of *Citrobacter diversus* (Burkay) Werkman and Gillen and designation of the neotype strain. Int. J. Syst. Bacteriol., 22:12-18, 1972.
4. Gordon, R.E. & Smith, M.M. — Proposed group of characters for the separation of *Streptomyces* and *Nocardia*. J. Bacteriol., 69:147-150, 1955.
5. Kurup, P.V. & Schmitt, J.A. — Numerical taxonomy of *Nocardia*. Can. J. Microbiol., 19:1036-1048, 1973.
6. Prieto, G.; Vargas, J.; Bracho, H. & Mestroni, M. — Caracterización bioquímica y significado clínico de una especie recientemente descrita dentro de la familia enterobacteriaceae: *Citrobacter diversus*. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 8:89-93, 1977.
7. Sheth, N.K. & Kurup, P.V. — Evaluation of Tyrosine medium for the identification of *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol., 1:483-485, 1975.
8. Washington, J.A., II Yu, P.K.W & Martin, W.J. — Hydrogen sulphide-negative variant of *Citrobacter*. Appl. Microbiol., 20:587-589, 1970.

Seroepidemiological study on the prevalence of human toxoplasmosis in Brazil*

Ilvan D. Ricciardi*
 Paulo C. Sabroza**
 E. Daniel Sandoval*
 & W. Mayrink***

Summary

Human sera (1410) were collected in 20 states of Brazil, representatives of five geopolitic regions. The indirect immunofluorescence technique was used to identify antibodies against *T. gondii*. About 61% reactors were identified. The prevalence was higher in the Northern region among the autochthonous (more than 10 years living in the same region, without migration) than among the mixed population from the same region. There was no correlation between the number of reactors and epidemiologic aspects considered such as sex, skin colour, blood group and rural or urban living. A definitive correlation was found between the number of reactors and factors such as age, contact with animals, and profession or the kind of activity individuals were engaged in. The distribution of titres among reactors was also examined. The test of Komolgorov-Smirnov showed the heterogeneous distribution of titres among reactors classified according to age and contact with animals. A similarity in the distribution of titres was obtained for individuals grouped according to sex, skin colour, blood group and residence in urban or rural areas.

Resumo

Estudo soro-epidemiológico da prevalência de toxoplasmose humana no Brasil

Foram estudados 1410 soros humanos, colhidos em 20 estados do Brasil, representativos das cinco regiões geopolíticas. Foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta para identificar anticorpos contra o *T. gondii*. Foram encontrados cerca de 61% de reatores. A prevalência na região Norte foi maior entre os autóctones (indivíduos residentes há mais de 10 anos na região, sem migração) do que a população mista da mesma região. Não houve relação entre o número de reatores e fenótipos epidemiológicos ou aspectos considerados como sexo, cor, grupo sanguíneo e ambiente de domicílio (rural ou urbano). Uma relação definida foi encontrada entre o número de reatores e fatores tais como idade, contato com animais e profissão e/ou ocupação principal. Foi examinada, também, a distribuição de títulos entre os reatores. O teste de Komolgov-Smirnov mostrou uma distribuição heterogênea de títulos entre os reatores classificados de acordo com o grupo etário e o contato com animais. Uma grande semelhança foi verificada na distribuição dos títulos à amostra grupada segundo o sexo, a cor, o grupo sanguíneo e o ambiente de domicílio.

Introduction

In 1964, with the collaboration of the Brazilian and American Air Forces and the human serum bank of the World Health Organization, the

Institute of Microbiology (Federal University of Rio de Janeiro) collected 3,000 serum samples from recruits over the entire Brazilian territory (6). Several serological surveys were carried out with this material, comprising various infectious diseases including toxoplasmosis (9, 18).

* Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, 20000 Rio de Janeiro RJ.

** Presidente Castelo Branco Institute.

*** Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Brazil.

In view of the rather interesting results obtained in such surveys, another nationwide collection of sera was made in 1973. In this case sera were collected from apparently healthy persons of both sexes, different ages, living in rural as well as in urban places. In a previous communication (13) we reported preliminary results on the prevalence of reactors to *Toxoplasma gondii* in the latter serum sampling. In the present paper we studied additional factors which may influence the prevalence of such reactors.

Material and Methods

Human sera (1410) collected in 20 States of Brazil and representing 5 geopolitical regions (Figs. 1 and 2) were studied. In every case in-

Figure 1 — Distribution of the serum samples in the Brazilian States

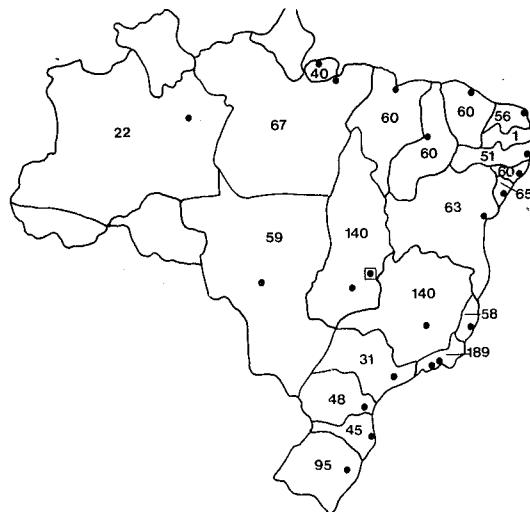
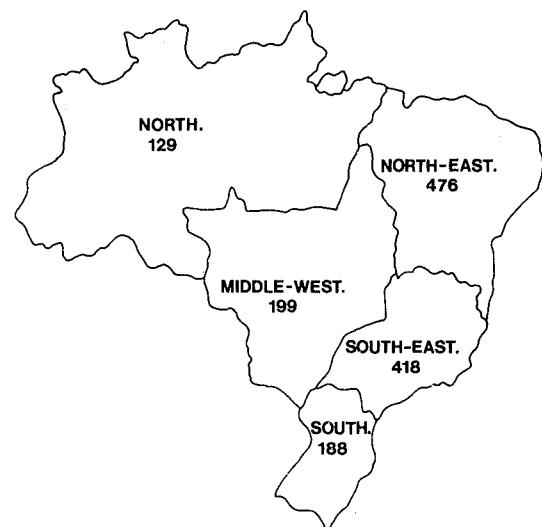


Figure 2 — Serum sample distribution in the Brazilian geographic regions



formation was obtained on the place of birth, actual address, migrations in the last 10 years, area of residence (rural or urban), age, sex, skin colour, blood group, profession and eventual contact with animals. Blood groups were determined in our laboratory. The serum sample distribution according to these characteristics is shown in Tables 1, 2, 3, 4 and 5. The information about the place of birth, address and migrations can be found in a previous communication (13).

Sera were analysed by the indirect immunofluorescence method. Antigens and reagents were prepared in our laboratory. Each serum was examined at 1:16 to 1:2048 dilutions. Reactors had sera with titres equal to or higher than 1:16. The χ^2 test for the comparison of the frequencies of reactivity among different sera was

Table 1 — Sampling distribution according to geographic region, age, sex and residence in rural or urban areas

Geographic Regions		North	North-East	South	Middle-West	South-East	Sub-Total	Sub-Total	Ignored	Total
Sampling Distribution	Age (years)	0 - 5	—	13	17	12	15	57		
Age (years)	6 - 20	39	263	101	87	213	703	1280	130	1410
	> 20	45	192	68	66	149	520			
Sex	Males	76	261	100	94	201	732	1284	126	1410
	Females	12	206	85	67	182	552			
Residence	Rural	—	201	75	77	121	474	1252	158	1410
	Urban	85	261	106	68	258	778			

used. The differences among the titres distribution curves were examined by the Komolgorov-Smirnov test.

Table 2 — Percentages of reactors and sampling distribution in relation to skin colour

Skin colour	Examined	Reactors	%
Whites	571	340	59.54
Mulatos	319	201	63.00
Black	71	42	59.15
Total	961 (*)	583	60.66

$$\chi^2 = 1.1031 < \chi^2_{0.05} : 2 = 5.99$$

(*) Ignored — 499

Table 3 — Percentages of reactors and sampling distribution in relation to the blood group

Blood Group	Examined	Reactors	%
Group O	517	338	65.36
Group A	345	201	58.26
Group B	125	80	64.00
Group AB	88	57	64.77
Total	1075 (*)	676	62.88

$$\chi^2 = 4.72 < \chi^2_{0.05} : 3 = 7.82$$

(*) Ignored — 335

Table 4 — Percentages of reactors and sampling distribution in relation to contact with animals(*)

Contact with animals (*)	Examined	Reactors	%
Yes	515	342	66.40
No	301	170	56.47
Total	861 (**)	512	62.47

$$\chi^2 = 7.595 > \chi^2_{0.05} : 1 = 3.84$$

(*) Domestic animals

(**) Ignored — 594

Results

Among the 1410 serum samples examined, 860 (60.9%) were reactors. A high prevalence of reactors was observed in the autochthonous population from the Northern region (75.3%) in contrast with the somewhat lower prevalence in the mixed population from the same region (63.5%). Such a difference between the two populations was statistically significant (Table 6).

Among 1280 individuals grouped according to age (Table 1) it was possible to distinguish 3 groups with different prevalences of reactivity (Table 7). It was observed in these groups that the number of reactors increased with age. By observing the distribution of serological titres in

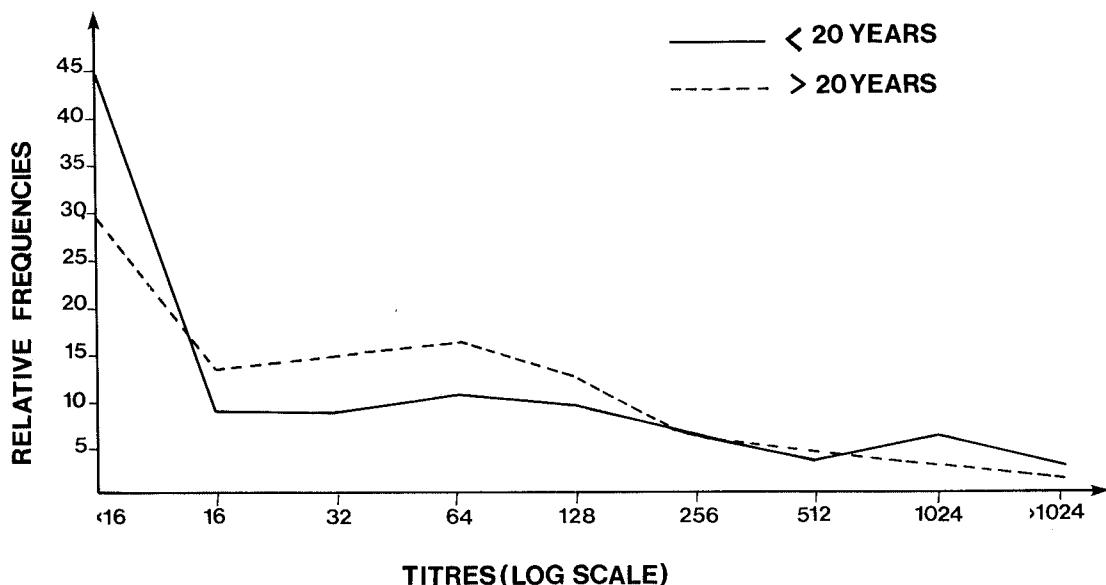
Table 5 — Percentages of reactors and sampling distribution in relation to the profession or main occupation

Profession or main occupation	Examined	Reactors	%	Age-standardized percentage
Pre-school children	57	24	42.11	61.81
Under-graduated students	388	209	53.86	58.51
Peasants	83	63	75.91	70.06
Home servants	136	82	60.29	55.81
Military individuals	57	38	66.66	67.84
Civil workers	41	33	80.48	72.53
Salesmen	16	13	81.25	72.91
University-graduated individuals	63	32	50.79	45.03
Total	841 (*)	494	58.74	

$$\chi^2 = 35.003 > \chi^2_{0.05} : 7 = 14.1$$

(*) Ignored — 569

Figure 3 — Distribution of relative frequencies of reactors as observed in the sample divided to age groups gathered as a function of the difference in the serological reactivity



the sera classified in the 3 age groups no differences emerged in the two groups comprising individuals less than 20 years old. Thus, although 3 age groups could be distinguished according to the prevalence of reactors only two large groups (individuals $>$ 20 and $<$ 20 years old) were recognized on the basis of the distribution of the serological titres (Fig. 3).

The frequencies of reactivity were also studied in 1284 individuals in relation to sex (64.1% males and 58.9% females) and in 1252 individuals in relation to the area of residence (63.3% urban; 60.9% rural).

The χ^2 test used in the analysis of prevalences of reactors in relation to skin colour (Table 2) and blood group (Table 3) did not show significative differences between opposing groups indicating that both parameters do not influence the number of reactors.

In contrast, the number of reactors among individuals who reported to have had close or sporadical contact with animals increased when compared with those who had not (Table 4).

Among 841 individuals it was possible to correlate the serological reactivity with their profession or main occupation (Table 5). The prevalence of reactors among University-educated individuals was low in comparison with that among peasants, civil workers and salesmen. In the latter group the proportion of reactors was higher than 75%. The χ^2 test confirmed the significance of such difference.

Discussion

The high prevalence of reactors to *T. gondii* in our serum sampling confirms the one previously found in Brazil and other countries (1, 2, 9, 12 and 14). It is noticeable the difference between the proportions of reactors observed in autochthonous and mixed populations from the Northern region. The age-standardized prevalence of reactors from this region did not influence the frequencies of reactivity (Table 6). In a similar way contact with animals had no influence on the frequency of reactors. The high proportion of reactors among the autochthonous population from the Northern region could be related to characteristics such as humidity, hot weather and high rain-fall density. Such conditions favour the survival of oocysts of *T. gondii* in the soil and, consequently, the increase in the number of reactors from places where those environmental conditions prevail (5, 7, 12 and 16).

Another possibility for the high prevalence of reactors in the Northern region could be the occurrence of an epidemic outbreak ten or more years ago, which may have favoured the immunological response of the autochthonous population. Unfortunately, we could not obtain representative sera from individuals in the 0-10 years age group in the Northern region (Table 1) so we cannot at present discern between these possibilities. Reports by Walls & Kagan (18) and Lamb & Feldman (9) who worked with

Table 6 — Normal and age-standardized percentages for the 5 geographic regions

Geographic regions	Autochthonous population (*)		Mixed population	
	Normal percentage	Age-standardized percentage	Normal percentage	Age-standardized percentage
Northern	75.34	73.58	63.56	60.73
North-East	60.05	59.86	58.19	58.31
Middle-West	53.85	55.35	56.28	57.38
South-East	63.42	63.32	66.27	65.91
Southern	59.72	60.28	59.57	60.24

(*) Ten or more years resident in the same region

sera from Brazilian recruits, sampled in 1964, also found the highest prevalence of reactors among inhabitants of the Northern region which confirms our results.

The present data also suggests that the prevalence of reactors in the Northern region tends to change in part due to migration. The collection of sera presently studied was carried out at a time when the Transamazonica Road was under construction. This road in conjunction with several other governmental initiatives aimed at fixing in the region populations coming from other States, mainly Southern, are important factors in determining the number of reactors. Migrations have already been reported as a cause in the modification of the immunological response of a community (4, 15).

The correlation between the increase in the number of reactors and ageing has been constantly reported (4, 11, 12 and 17). In the present paper, the high prevalence of reactors in the 0-5 years age group suggests that the infection by *T. gondii* in Brazil occurs during the first years after birth. This is reinforced by a decrease in the average geometric titres and the annual frequencies of serological conversion calculated

for each of the age groups (Table 7). The homogeneity in the distribution of titres in the 0-5 and 6-20 years age groups otherwise differentiated according to the prevalence of reactors probably is due to the stability of *Toxoplasma* antibodies produced during the primary infection (Fig. 3).

The possibility of associating sex with the prevalence of reactors to *T. gondii* has also been investigated (3, 12). Our results show that the slight superiority in the number of male reactors was not statistically significant. No significant differences were also observed among individuals according to sex, the age group and the place of living. Apparently, the chance of exposition to *T. gondii* is the same in individuals of both sexes. This is suggested because the titre distribution curves in the male and female groups superimpose (Fig. 4).

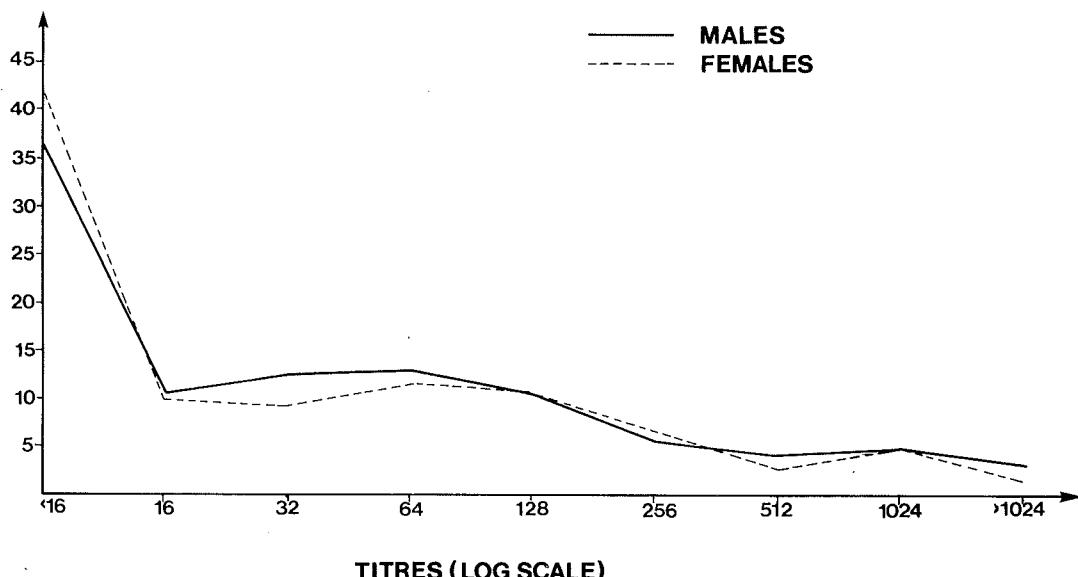
In what concerns the place of living, Walls & Kangan (18) and Lamb & Feldman (9) reported conflicting data with the former authors describing a predominance of reactors in rural places whereas the latter finding a greater prevalence of reactors in urban places. Considering that both reports dealt with the same serum sam-

Table 7 — Percentages of reactors, average geometric titres, annual frequencies of serological conversion and sampling distribution in relation to age groups

Age group (years)	Examined	Reactors	%	Average geometric titres	Annual frequencies of serological conversion %
0 — 5	57	24	42.11	131.75	10.52
6 — 20	703	400	56.90	108.75	1.06
> 20	520	367	70.58	74.58	0.34

$$\chi^2 = 33.47 > \chi^2_{0.05} : 2 = 5.99$$

Figure 4 — Distribution of relative frequencies of reactors as observed in the sample classified according to sex



pling (recruits sera) but since different serological techniques were used it is difficult to explain such discrepancies.

A few considerations ought to be made on the difficulties in sampling individuals from the rural areas. The authenticity of a permanent rural residence can sometimes be questioned in Brazil. The increasing communication facilities and attraction exerted by the urban centres by and large induce the rural man to live alternately in rural and urban places. The migration to the urban centres of peasants in the periods between the harvests is frequent. Thus, it is rather difficult to study a population of "autochthonous rural inhabitants". It is possible that the similar proportions of reactors obtained among individuals from both rural and urban areas are determined by other factors such as the contact with animals and others. Contact with animals has already been reported (8, 10) as a factor influencing the number of *Toxoplasma* reactors. Apparently, there is no relation between the latter factor and the two habitats discussed above if one has in mind that the cat is the domestic animal mainly responsible for the transmission of toxoplasmosis.

Contact with animals as a factor favouring the greater exposition to *T. gondii* is widely accepted in the epidemiology of toxoplasmosis. We should thus expect an increased prevalence of reactors among individuals who had reported contacts with animals. The absence of such reports however does not exclude the chance of contamination with animal faeces. Cat eliminate infectious oocysts that survive in the soil

for long periods of time (7). In the present paper the higher prevalence of reactors among individuals who reported selective contact with cats could not be confirmed possibly due to their low number in relation to individuals having contacts simultaneously with other animals.

If the contact with animals favours the infection with *Toxoplasma* it seems obvious that the main occupation or the profession are factors intimately related to the epidemiology of this zoonosis. Individuals graduated at the University as expected showed a low frequency of reactors. In contrast the number of reactors among children in the first age group was high (Table 5). The result observed concerning the group of salesmen must be regarded with caution because of the small sampling. In relation to the military individuals, they were mostly recruits and not career personnel. This could explain the high frequency of reactors found in this group similar to that for other groups presumably with greater risks of contamination with *T. gondii*.

References

1. Araujo, F.G. — Anticorpos ar *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 12:105, 1970.
2. Baruzzi, R.G. — Contribution to the study of the toxoplasmosis epidemiology. Serologic survey among the Indians of the upper Xingu River, Central Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 12:93, 1970.

3. Feldman, H.A. & Miller, L.T. — Serological study of toxoplasmosis prevalence. Am. J. Hyg., 64:320, 1956.
4. Fleck, D.G. — Toxoplasmosis and Tristan de Cunha. H. Hyg. (Camb.), 63:389, 1965.
5. Fleck, D.G. — The seroepidemiology of *Toxoplasma* infection in man. Proc. Roy. Soc. Med., 65:1002, 1972.
6. Florey, C. du V.; Cuadrado, R.R.; Henderson, J.R. & Goes, P. de — A nationwide serum survey of brazilian military recruits, 1964. Am. J. Epidem., 86:314, 1967.
7. Frenkel, J.K.; Ruiz, A. & Chincilia, M. — Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. Am. J. Trop. Med. Hyg., 24:439, 1975.
8. Gibson, C.L. & Eyles, D.E. — *Toxoplasma* infections in animals associated with a case of human congenital toxoplasmosis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 6:990, 1957.
9. Lamb, G.A. & Feldman, H.A. — A nationwide serum survey of Brazilian military recruits, 1964. III — *Toxoplasma* dye test antibodies. Am. J. Epidemiol., 87:323, 1968.
10. McCulloch, W.F.; Braun, J.L.; Heggen, D.W. & Top, F.H. — Studies on medical and veterinary students skin tested for Toxoplasmosis. Pub. Hlth. Rep., 78:689, 1963.
11. Peterson, D.R.; Cooney, M.K. & Beasley, R.P. — Prevalence of antibody to *Toxoplasma* among Alaskan natives: relation to exposure to the *Felidae*. J. Inf. Dis., 130:557, 1974.
12. Remington, J.S.; Efrom, B.; Cavanaugh, E.; Simon, H.J. & Trejos, A. — Studies on toxoplasmosis in El Salvador. Prevalence and incidence of toxoplasmosis as measured by the Sabin-Feldman dye test. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 64:252, 1970.
13. Ricciardi, I.D.; Daniel, E.S. & Mayrink, W. — Preliminary notes on the prevalence of human toxoplasmosis in Brazil. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 69:516, 1975.
14. Roever-Bonnet, H. — Toxoplasmosis in tropical Africa. Trop. Geogr. Med., 24:7, 1972.
15. Seah, S.K.K. — *Toxoplasma* antibodies in immigrants from Hong-Kong. J. Hyg. (Camb.), 72:19, 1974.
16. Szabo, T. — The present state of toxoplasmosis. Mount Sinai J. Med., 41:765, 1974.
17. Wallace, G.D.; Marshall, L. & Marshall, M. — Cats, rats, and toxoplasmosis on a small Pacific Island. Am. J. Epidemiol., 95:475, 1972.
18. Walls, K.W. & Kagan, I.G. — Studies on the prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii*. 2 — Brazil. Am. J. Epidemiol., 86:305, 1967.

**Sensibilidade de *Citrobacter diversus*
(*Levinea malonatica*) e
Levinea amalonatica a antimicrobianos***

José R. F. Brito
Ivone R. Suassuna
& Ítalo Suassuna

Resumo

Testes de sensibilidade a quimioterápicos, com 55 amostras de *C. diversus*, 12 de *L. amalonatica* e três amostras de comportamento bioquímico intermediário entre as três espécies. As 70 amostras foram isoladas de material clínico humano, a partir de urina, fezes, secreções traqueobrônquicas, incisão cirúrgica, sangue, fossa nasal, e de líquido seminal, as quais revelaram resistência à penicilina e seus derivados (oxacilina, cloxacilina, nafcicina e ampicilina). Mais de 90% mostrou sensibilidade ao cloranfenicol, kanamicina, gentamicina, nitrofurantoína e trimetoprim-sulfametoaxazol. Houve variações no grau de sensibilidade com relação a neomicina, estreptomicina, sulfadiazina e sulfisoxazol com pequenas diferenças de comportamento entre as espécies. O exame das amostras de *C. diversus* revelou que 63,6% e 94,5% eram resistentes à cefaloridina e carbenicilina, respectivamente, enquanto as amostras de *L. amalonatica* mostraram percentuais de resistência de 100% e 58% às duas drogas.

Summary

Susceptibility of Citrobacter diversus (Levinea malonatica) and Levinea amalonatica to antimicrobial agents

In vitro susceptibility tests to antimicrobial agents were performed with 70 strains of related microorganisms, represented by the 55 strains of *Citrobacter diversus*, 12 of *Levinea amalonatica* and three of intermediate behavior. The strains were isolated from human pathological materials including urine and stool specimens, tracheobronchial and nasal secretions, seminal fluid, surgical wound discharges and blood. In all cases, the strains were resistant to penicillin and most of its derivatives (oxacillin, cloxacillin, nafcillin and ampicillin). On the other hand, sensitivity was observed above the level of 90 percent of the culture to chloramphenicol, kanamycin, gentamicin, nitrofuranoin and the association trimetoprim-sulfametoaxazole. Variable results were obtained in relation with neomycin, streptomycin and sulfonamide derivatives (sulfadiazine and sulfisoxazol) but there was no difference between the two species. The resistance of *C. diversus* to cephaloridine and carbenicillin reached 63,6 and 94,5 per cent, respectively, while to *L. amalonatica* obtained to both antibiotics were 100,0 and 58,0 per cent, respectively.

Introdução

O poder patogênico de *Citrobacter diversus* (*Levinea malonatica*) e *Levinea amalonatica*, embora discutível, tem sido posto em evidência através do isolamento destas bactérias em várias patologias humanas. Estas bactérias, à semelhança de *Citrobacter freundii*, parecem capazes de causar doenças, especialmente no hospedeiro debilitado ou em pacientes de idade

avançada mas, de um modo geral, têm sido isoladas, com maior freqüência, como comensais ou saprófitas (5, 11, 14, 15, 19). Entretanto, alguns relatos mencionam seu isolamento como único organismo infectante ou como invasor secundário em uma série de infecções que incluem os tratos urinário, digestivo e respiratório (2, 7, 11, 15, 16, 23, 26). Casos de meningite, às vezes fatais, foram descritos em recém-nascidos (6, 8, 9, 12, 22).

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

Com freqüência variada tem sido citado, ainda o isolamento destes microrganismos em casos de otite, sinusite, feridas infectadas, úlcera corneal, colecistite, conjuntivite, em líquor, escarro, pus, sangue, secreção vaginal e de alimentos relacionados a casos de diarréia (1, 2, 6, 7, 13, 15, 16, 17, 19, 20, 24, 25).

Pela crescente importância clínica destes microrganismos, seu comportamento frente aos quimioterápicos tem sido objeto de estudo por parte de alguns pesquisadores. Talbot & col. (21) descreveram que as amostras por eles estudadas eram resistentes a penicilina e sensíveis a aureomicina e tetraciclina, mostrando sensibilidade variável a cloranfenicol, estreptomicina e sulfonamidas. Slifkin & Engwal (18), Washington & col. (25), Booth & McDonald (5), Gross & col. (8), Gwynn & George (9), Smith & col. (19), Holmes & col. (10), Juif & col. (12), Lund & col. (13), Tamborlane & Soto (22) e Altmann & col. (2), informaram a resistência à ampicilina, penicilina, cloxacilina, carbenicilina, naftcilina e sensibilidade a ácido nalidíxico, cloranfenicol, neomicina, knamicina, polimixina B, cefalotina, cefalexina, cefalofosprina, tetraciclina, gentamicina, colimicina, furadantina, sulfadiazina e sulfisoxazol.

Zechovsky & col. (26) trabalharam com amostra de *L. malonatica* e relataram resistência à cefaloridina, estreptomicina, canamicina e gentamicina e sensibilidade à cefalexina, nibiol e furantoína.

Em 1974 Holmes & col. sugeriram que os testes de sensibilidade à cefaloridina e carbenicilina seriam úteis na diferenciação entre *C. freundii* e *Citrobacter koseri*. O exame de 99 amostras de *C. freundii* revelou 79% de resistência à cefaloridina e sensibilidade à carbenicilina enquanto 96% de 45 amostras de *C. koseri* (incluindo *C. diversus*, *L. malonatica* e *L. amalonatica*) eram sensíveis à cefaloridina e resistentes à carbenicilina.

Este estudo visa a determinação dos padrões de sensibilidade a quimioterápicos, em 70 amostras, sendo 55 identificadas como *C. diversus* e 12 como *L. amalonatica*. Três amostras revelaram-se com comportamento bioquímico intermediário entre estas espécies, mas relacionaram-se antigenicamente a *C. diversus*.

Material e Métodos

As 70 amostras utilizadas foram isoladas de material clínico humano, em laboratório clínico

particular, na cidade do Rio de Janeiro. Destas, 43 amostras foram isoladas de urina, 12 de fezes, quatro de secreção traqueobrônquica, uma 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.

Os testes de sensibilidade foram realizados segundo a técnica de Bauer & col. (3), utilizando-se discos impregnados de quimioterápicos (DIFCO) e meio de Müller-Hinton (Merck).

Resultados

O resultado dos testes de sensibilidade aos quimioterápicos está mostrado na Tabela 1.

Todas as amostras foram resistentes à penicilina, oxacilina, cloxacilina e naftcilina. Apenas duas amostras de *L. amalonatica* mostraram-se sensíveis à ampicilina.

Os testes revelaram que mais de 90% das amostras foram sensíveis a cloranfenicol, gentamicina, nitrofurantoína, sulfametoxazol-trimetoprim e canamicina; com relação a última droga, apenas 83,3% das amostras de *L. amalonatica* mostraram-se sensíveis.

Os resultados obtidos com relação à neomicina, estreptomicina, sulfadiazina, sulfisoxazol, cefaloridina e carbenicilina foram variáveis, tanto em relação ao grau de sensibilidade, quanto a diferenças de comportamento entre as duas espécies.

As amostras classificadas como intermediárias revelaram comportamento similar ao de *C. diversus*.

Discussão

Os resultados encontrados neste trabalho, com pequenas variações, estão de acordo com os obtidos pela maioria dos autores que se ocuparam do assunto. Foram diferentes, em relação ao cloranfenicol, dos resultados encontrados por Talbot & col. (21). Com referência aos testes de sensibilidade à penicilina e seus derivados (oxicilina, cloxacilina, naftcilina e ampicilina), os resultados foram idênticos aos encontrados por Slifkin & Engwall (18), Washington & col. (25), Booth & McDonald (5), Gross & col. (8), Gwynn & George (9), Smith & col. (19), Holmes & col. (10), Juif & col. (12), Lund & col. (13), Tamborlane & Soto (22) e Altmann & col. (2).

Tabela 1 — Comportamento, frente a quimioterápicos, de 55 amostras de *Citrobacter diversus*, 12 de *Levinea amalonatica* e 3 amostras de comportamento bioquímico intermediário entre as duas espécies

Quimioterápicos	<i>C. diversus</i>				Intermediárias				<i>L. amalonatica</i>			
	S*	%***	R**	%***	S	%	R	%	S	%	R	%
Penicilina	0	—	55	100,0	0	—	3	100,0	0	—	12	100,0
Ampicilina	0	—	55	100,0	0	—	3	100,0	2	16,7	10	83,3
Oxacilina	0	—	55	100,0	0	—	3	100,0	0	—	12	100,0
Cloxacilina	0	—	55	100,0	0	—	3	100,0	0	—	12	100,0
Nafcilina	0	—	55	100,0	0	—	3	100,0	0	—	12	100,0
Carbenicilina	3	5,4	52	94,6	0	—	3	100,0	5	41,7	7	58,3
Cefaloridina	20	36,4	35	63,6	1	33,3	2	66,7	0	—	12	100,0
Nitrofurantoína	55	100,0	0	—	3	100,0	0	—	11	91,7	1	8,3
Sulfadiazina	36	65,4	19	34,6	3	100,0	0	—	5	41,7	7	58,6
Sulfisoxozol	45	81,8	10	18,2	3	100,0	0	—	5	41,7	7	58,3
Sulfametoxazol-	52	94,6	3	5,4	3	100,0	0	—	12	100,0	0	—
Trimetoprim												
Estreptomicina	47	85,4	8	14,6	3	100,0	0	—	7	58,3	5	41,7
Neomicina	49	89,1	6	10,9	2	66,7	1	33,3	10	83,3	2	16,7
Canamicina	51	92,7	4	7,3	3	100,0	0	—	10	83,3	2	16,7
Gentamicina	54	98,2	1	1,8	3	100,0	0	—	12	100,0	0	—
Cloranfenicol	53	96,4	2	3,6	3	100,0	0	—	11	91,7	1	8,3

*S — sensibilidade

**R — resistência

*** — porcentagem

Os testes de sensibilidade às demais drogas incentivaram resultados em concordância ou com pequenas variações, quando comparados aos dos autores citados.

A resistência à carbenicilina, de amostras de *C. diversus*, foi comparável aos resultados obtidos por Smith & col. (19), Lund & col. (13) e Madrazo & col. (15 e 16). Foram observadas diferenças de comportamento entre as amostras de *C. diversus* e *L. amalonatica* quando testadas frente a cefaloridina e carbenicilina, como já havia sido notado, anteriormente, entre *C. freundii* e *C. koseri*, por Holmes & col. (10) e neste sentido, as amostras de *C. diversus* comportaram-se de modo semelhante às de *C. koseri*, enquanto o comportamento de *L. amalonatica* foi similar ao das amostras de *C. freundii* estudadas por aqueles autores. Estas observa-

ções vêm corroborar a opinião de diversos autores a respeito da identidade de *C. diversus*, *C. koseri* e *L. amalonatica*, que se constituiriam numa única espécie, sob a designação de *C. diversus*, enquanto *L. amalonatica* constituir-se-ia em espécie à parte.

Os resultados obtidos com as amostras de comportamento bioquímico intermediário, especialmente em relação à carbenicilina, aproximaram-se de *C. diversus*, confirmando os resultados de testes sorológicos já realizados por Brito (4).

Como havia sido apontado por Holmes & col. (10), os testes de sensibilidade à cefaloridina e carbenicilina mostraram-se úteis na diferenciação entre as espécies *C. diversus* e *L. amalonatica*.

Referências Bibliográficas

1. Aldova, E. & Sourek, J. — First isolations of *Levinea Citrobacter* cultures in Czechoslovakia. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 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. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M. & Sherris, J.C. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am. J. Clin. Pathol., 45:493-496, 1966.
4. Brito, J.R.F. — Caracterização e classificação de *Citrobacter diversus* (Levinea). Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1976. 112 p. (Tese de Mestrado).

5. Booth, E.V. & McDonald, S. — A new group of enterobacteria, possibly a new *Citrobacter* sp. J. Med. Microbiol., 4:329-336, 1971.
6. Duhamel, M.; Cuvelier, A.; Cousin, J. & Fournier, A. — Septicémie et méningite néo-natales à *Levinea malonatica*. Nouv. Presse Med., 4:428, 1975.
7. Fauconier, B.; Cormier, M. & Fabiani, G. — Le rôle pathogène de souches de *Levinea* isolées de 10 produits pathologiques. Nouv. Presse Med., 3:2026, 1974.
8. Gross, R.J.; Rowe, B. & Easton, J.A. — Neonatal meningitis caused by *Citrobacter koseri*. J. Clin. Pathol., 26:138-139, 1973.
9. Gwynn, C.M. & Georges, R.H. — Neonatal *Citrobacter* meningitis. Arch. Dis. Childhood, 48:455-463, 1973.
10. Holmes, B.; King, A.; Phillips, I. & Lapage, S.P. — Sensitivity of *Citrobacter freundii* and *C. koseri* to cephalosporins and penicillins. J. Clin. Pathol., 27:729-733, 1974.
11. Jones, S.R.; Ragsdale, A.R.; Kutscher, E. & Sanford, J.P. — Clinical and bacteriologic observations on a recently recognized species of *Enterobacteriaceae*, *Citrobacter diversus*. J. Infect. Dis., 128:563-565, 1973.
12. Juif, J.G.; Richard, C.; Lavillaureix, J.; Berland, H.; Scheegans, P. & Beauvais, P. — La méningite du nouveau-né à *Levinea malonatica*. Arch. Fr. Pediat., 31:759-764, 1974.
13. Lund, M.E.; Matsen, J.M. & Blazevic, D.J.D.J. — Biochemical and antibiotic susceptibility studies of H₂S negative *Citrobacter*. Appl. Microbiol., 28:22-25, 1974.
14. Macierzewicz, M. — A proposal of a new group (genus) of *Enterobacteriaceae*. Exptl. Med. Microbiol., 18:333-339, 1966.
15. Madrazo, A.; Geiger, J. & Lauter, C.B. — *Citrobacter diversus* at Grace Hospital, Detroit, Michigan. Am. J. Med. Sci., 270:497-501, 1975.
16. Madrazo, A.; Henderson, M.D.; Baker, L.; Vaitkevicius, V.K. & Lauter, C.B. — Massive empyema due to *Citrobacter diversus*. Chest, 68:104-106, 1975.
17. Rowe, B.; Gross, R.J. & Allen, H.A. — *Citrobacter koseri*. II — Serological and biochemical examination of *Citrobacter koseri* strains from clinical specimens. J. Hyg., 75:129-134, 1975.
18. Slifkin, M. & Engwall, C. — The clinical significance of *Citrobacter intermedium*. Amer. J. Clin. Pathol., 52:351-355, 1969.
19. Smith, R.F.; Dayton, S.L. & Chipps, D.D. — Recognition of *Citrobacter diversus* in the clinical laboratory. Appl. Microbiol., 25:157-158, 1973.
20. Sourek, J. & Aldova, E. — Serotyping of strains belonging to the *Citrobacter-Levinea* group isolated from diagnostic material. Zentralbl. Bakteriol. Parasit., Infekt. Hyg. I. Abt. Orig., 234A:480-490, 1976.
21. Talbott, J.M.; Cunliffe, A.C. & Gower, N.D. — The differentiation of coliform organisms infecting the urinary tract. J. Clin. Pathol., 10:222-225, 1957.
22. Tamborlane Jr., W.V. & Soto, E.V. — *Citrobacter diversus* meningitis: a case report. Pediatrics, 55:739-741, 1975.
23. Urbanczik, R. & Schmidt, W. — *Citrobacter diversus* en el esputo: hallazgo de un caso. Laboratorio, 29:342, 1974.
24. Van Oye, E.; Thevelin, M. & Richard, C. — Rapports antigéniques entre *Levinea amalonatica* et *Shigella dysenteriae* et *S. boydii*. Ann. Microbiol., (Inst. Pasteur), 126A:187-192, 1975.
25. Washington II, J.A.; Yu, P. & Martin, W.J. — Biochemical and clinical characteristics and antibiotic susceptibility of atypical *Enterobacter cloacae*. Appl. Microbiol., 17:843-846, 1969.
26. Zechovsky, N.; Bergogne-Berezin, E. & Richard, C. — Une infection urinaire à *Levinea malonatica*. Nouv. Presse Med., 2:584, 1973.

Purification and kinetic studies of glucose 6 phosphate dehydrogenase from *Polyporus circinatus*

Shigehiro Funayama*
& Glaci T. Zancan*

Summary

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) from *Polyporus circinatus* was purified to a homogeneous form. The molecular weight of purified enzyme was estimated to be 120.000 by sodium dodecylsulfate-urea polyacrylamide gel electrophoresis. Kinetic studies of the reaction were made at pH 8.2. The apparent Michaelis constants for NADP and G6P are 42,9 μ M and 258 μ M, respectively. The G6P dehydrogenase activity was competitively inhibited by NADPH with respect to both NADP and G6P. These data are consistent with a rapid equilibrium random mechanism. The G6P dehydrogenase activity was inhibited by ADP and ATP in a competitive manner with respect to G6P and NADP. The apparent Ki values for ADP were 8,6mM (NADP) and 7,0mM (G6P) and for ATP were 7,6mM (NADP) and 5,2mM (G6P).

Resumo

Purificação e estudos cinéticos da glucose 6 fosfato desidrogenase de Polyporus circinatus

A glucose 6 fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49) dependente de nicotinamida adenina dinucleóideos fosfato (NADP) foi purificada em forma homogênea a partir de *Polyporus circinatus*. O peso molecular da enzima purificada foi de 120.000, quando determinado por elektroforese em gel de poliacrilamida, em presença de sodium dodecil sulfato. Os estudos cinéticos da reação entre NADP e glucose 6 fosfato (G6P), catalisada pela enzima, foram realizados a pH 8,2. A constante de Michaelis, aparente para o NADP e a G6P, foi de 42,9 μ M e 258 μ M respectivamente. A atividade da G6P desidrogenase foi inibida, competitivamente, por NADPH, em relação ao NADP e à G6P. Estes dados estão de acordo com um mecanismo de rápido equilíbrio randomizado. A atividade da G6P desidrogenase foi inibida por ADP e ATP, de maneira competitiva, com relação à G6P e NADP. Os valores da constante da inibição (Ki)-para o ADP foram 8,6mM (NADP) e 7,0mM (G6P) e para o ATP foram 7,6mM (NADP) e 15,2mM (G6P).

Introduction

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) is the first enzymes of the pentose phosphate pathway and in several organisms has been shown to be regulated by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), adenosine 5' diphosphate (ADP) and adenosine 5' triphosphate (ATP) (1, 2, 6, 10, 12). However, no effect of ATP was observed in the enzyme isolated from *Penicillium* (3) and the kinetic analysis of that enzyme seems

to suggest a different mechanism compared to the others studied (14).

In previous work an unstable nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from the mold *Polyporus circinatus* Fries was partially purified and some of its properties studied (7). In the present work we performed a kinetic analysis of the effect of NADPH, ADP and ATP on a homogenous and stable preparation of glucose-6-phosphate dehydrogenase, in order to provide information about the mechanism reaction.

* Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 939, 80000, Curitiba, Paraná, Brasil.

Material and Methods

Growth of cells and preparation of the enzyme: *Polyporus circinatus* supplied by D. Amaral was grown as described by Markus (15) with 0.5% glucose as the sole carbon source. The mycelia were harvested by filtration after 24 hours of growth, washed with distilled water and kept frozen (-20°).

Frozen mycelia (48g) were ground with 20g of acid washed sea sand and suspended in 144ml of 0.1M Tris (hydroxymethylaminomethane) hydrochloride buffer, pH 8.2, containing 1mM mercaptoethanol and 1mM ethylenediamine tetracetate (EDTA). The suspension was centrifuged at 12.000g for 15 minutes and the supernatant was used as enzyme source. A protamine solution (2%) was added to the crude extract (160ml) to a final concentration of 0.15mg/ml of protein, and the mixture was centrifuged at 12.000g for 15 minutes. The protamine-treated solution (160ml) was mixed with wet diethylaminoethyl (DEAE) cellulose, previously equilibrated with 0.05M Tris-hydrochloride buffer, pH 8.2, in the proportion of 10g (dry weight) of DEAE cellulose per 720mg of protein. The suspension was filtered and 80% of enzyme remained in the filtrate. The filtrate obtained from DEAE cellulose treatment was adjusted to 60% saturation with solid ammonium sulfate and centrifuged at 12.000g for 15 minutes. The supernatant solution was discarded and the pellet was dissolved in 4ml of 0.1M Tris-hydrochloride buffer, pH 8.2, and then dialyzed for 5 hours against 0.05M Tris-hydrochloride buffer containing 1mM EDTA (pH 8.2). The dialysate was applied on a DEAE cellulose column previously equilibrated with the dialysis buffer. The enzyme was then eluted with a gradient of 0 to 0.5M NaCl made with the same equilibration buffer at a flow rate of 0.25ml/min. Fractions (4ml) were collected and analysed for glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6P dehydrogenase) activity and the fractions containing the activity were pooled and brought to 60% saturation of ammonium sulfate. Following centrifugation, the pellet was solubilized in 2.5ml of 0.1M Tris-hydrochloride buffer, pH 8.2, containing 30% saturated ammonium sulfate and stored at -10°. All procedures described were performed at 0-4°.

G6P dehydrogenase assay — The standard assay mixture (1ml) contained 50 μ moles of sodium glucose-6-phosphate (G6P) 0.5 μ moles of

nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) and the enzyme. The reaction was initiated by the addition of enzyme and the rate of NADP reduction was followed at 340nm in a D.U. 2 Beckman recording spectrophotometer. One unit of enzyme is defined as the amount that catalyses the reduction of 1 μ mol of NADP per minute at 26°. Specific activity is defined as units per milligram of protein. The molar extinction coefficient for NADPH was taken $6.22 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ (8).

Kinetics — G6P dehydrogenase preparation used in the kinetic experiments had a specific activity of 23 units/mg protein. Initial rate measurements were made at the optimum pH 8.2 (7) and the results are the average of 4 experiments.

Analytical methods — Protein concentration was determined by the method of Lowry (13) using serum albumin as standard. Chloride was determined by the method of Schales (17). Polyacrylamide disc gel electrophoresis and molecular weight determination were carried out as previously described (5).

Source of materials — ADP, ATP, NADP, NADPH, glucose-6-phosphate sodium salt, were purchased from Sigma Chemical Co. Lactate dehydrogenase, alkaline phosphate, carboxypeptidase A, gamma globulin, ovalbumin and myoglobin were obtained from Worthington Biochemical Corp. Coomassie brilliant blue, cytochrome c (from horse), bovine serum albumin (crystallized three times) were obtained from Sigma Chemical Co.

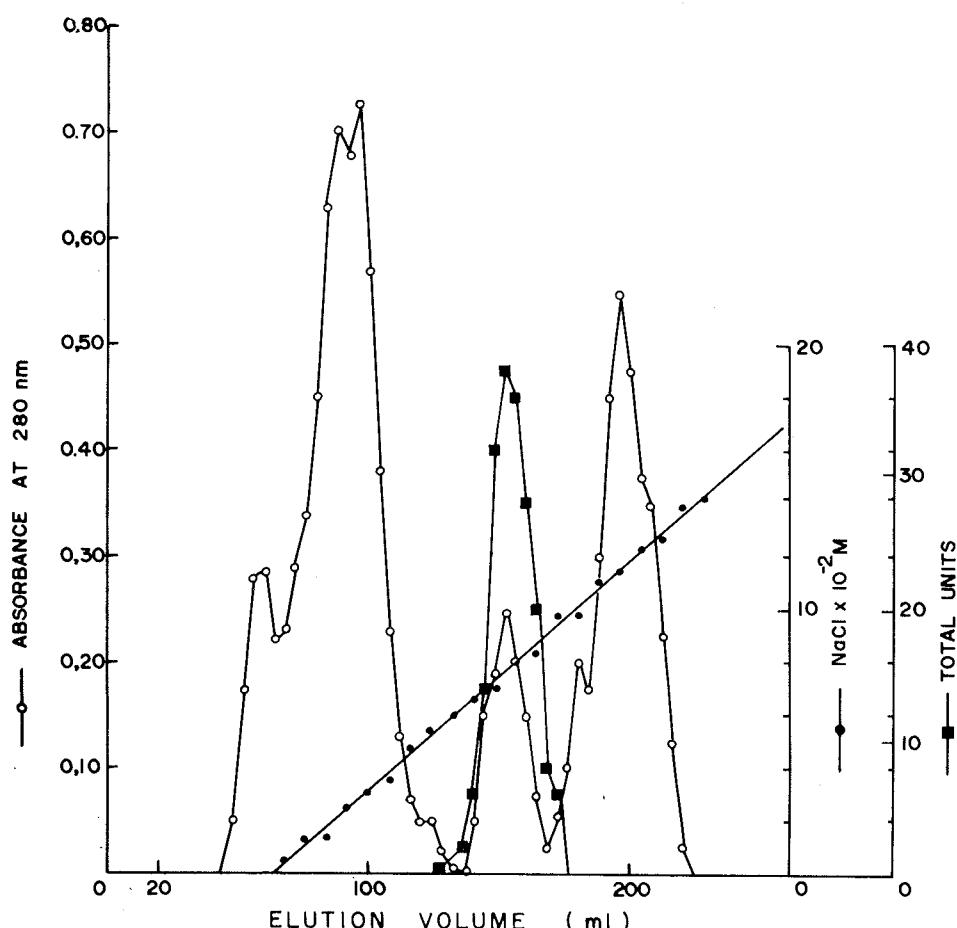
Results

Purification of the enzyme — Typical results of the purification procedure are shown in Table 1. Fig. 1 shows the DEAE cellulose column elution pattern of the G6P dehydrogenase from *Polyporus circinatus*. The purified enzyme retained full activity for at least one month when stored at -10°.

Homogeneity and molecular weight — The final preparation gave a single band in polyacrylamide disc gel electrophoresis at two different pH values (7.6 and 9.0) even at 200 μ g protein per gel disc. When submitted to polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of 1% so-

Table 1 — Purification of G6P dehydrogenase from *Polyporus circinatus*

Fraction	Total volume ml	Units/ml	Protein mg/ml	Sp. Activ. U/mg/protein	Recovery %
Cell extract	160	1.60	14.5	0.110	—
Protamine sulfate supernatant	160	1.60	9.8	0.163	100
DEAE cellulose	160	1.28	4.5	0.284	80
Ammonium sulfate 0-609 sat.	5	38.0	9.0	6.22	74
DEAE cellulose column	2.5	46.0	2.0	23.00	45

Figure 1 — Elution profile of glucose 6 phosphate dehydrogenase from DEAE-cellulose column.
○—○ protein; ■—■ GEP dehydrogenase activity; ●—● NaCl concentration

dium dodecylsulfate and 6M urea, only one band of protein was detected on the gels and the molecular weight was estimated at 120.000 (Fig. 2).

Kinetic studies — The double reciprocal plots of initial velocity studies are linear and they intersect at the left of $1/v$ axis (Fig. 3A, B). According to Cleland (4) this indicates that the substrates G6P and NADP must bind to the

enzyme before any product is released. The Michaelis constant values obtained are $42.9 \mu M$ for NADP and $258 \mu M$ for G6P.

Product inhibition studies — To distinguish between an ordered and a random mechanism, studies of inhibition by NADPH were carried out with NADP and G6P as the variable substrates. NADPH show competitive inhibition for both substrates (Fig. 4A, B).

Figure 2 — Determination of molecular weight from electrophoretic mobility on sodium dodecylsulphate urea polyacrylamide gel disc
 E = enzyme (G6P dehydrogenase from *P. circinatus*)

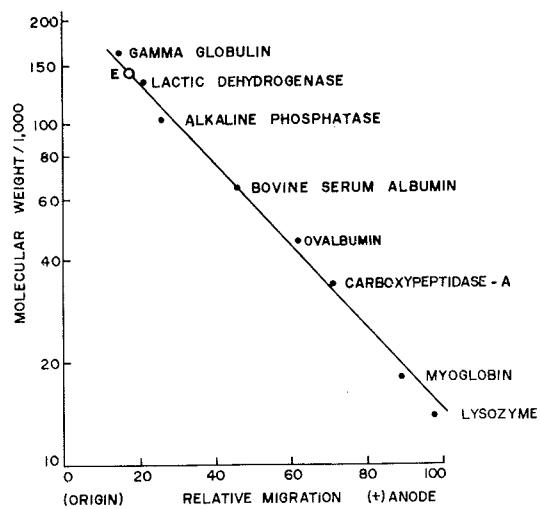


Figure 3A — Initial velocity studies: A — NADP as variable substrate. The glucose 6 phosphate concentration were: 1 = 2mM 2 = 1mM 3 = 0.5mM

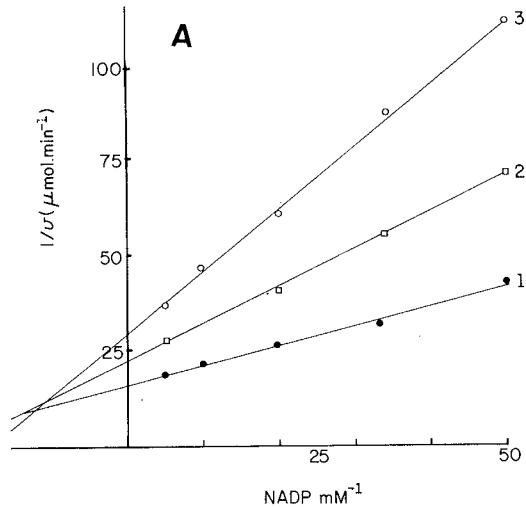


Figure 3B — Initial velocity studies. G6P as variable substrate. The NADP concentrations were: 1 = 0.2mM 2 = 0.07mM 3 = 0.05mM

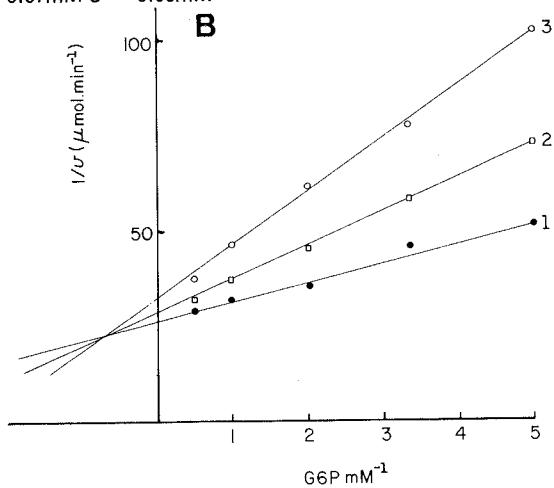


Figure 4A — Inhibition of glucose 6-phosphate dehydrogenase by NADPH. G6P concentration was 2mM

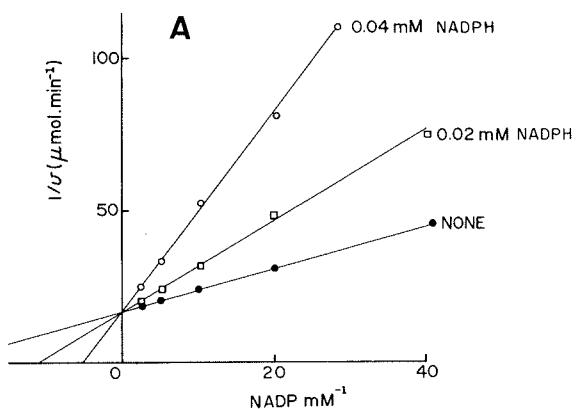
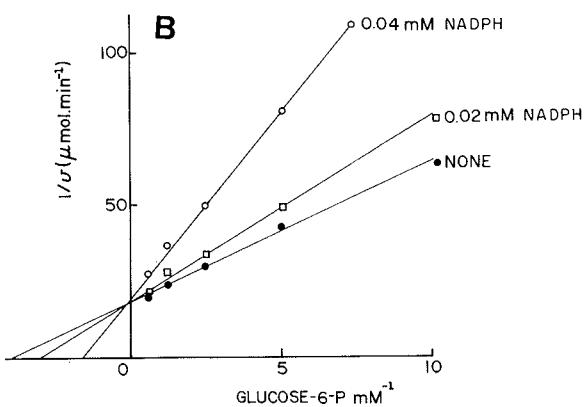


Figure 4B — Inhibition of glucose 6-phosphate dehydrogenase by NADPH. NADP concentration was 0.2mM



Inhibition by ADP and ATP — Fig. 5A, B shows that the inhibition by ADP was competitive with respect to NADP and G6P. The inhibition constants obtained from the linear replot of slopes versus the inhibitor concentration was 8.6mM and 7.0mM for NADP and G6P respectively.

Figure 5A — Inhibition of glucose 6-phosphate dehydrogenase by ADP. NADP concentration was 0.3mM

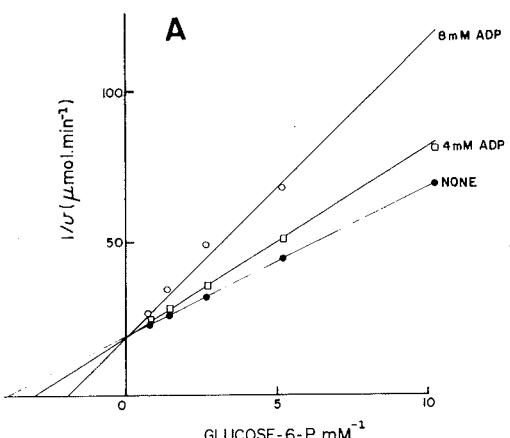
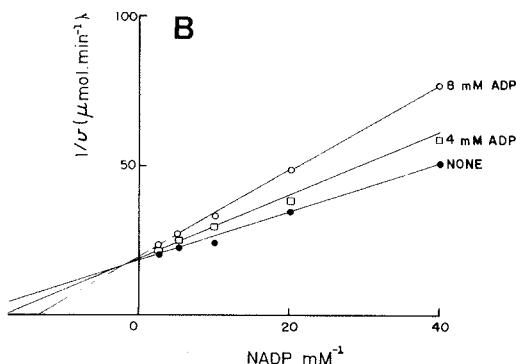


Figure 5B — Inhibition of glucose 6-phosphate dehydrogenase by ADP. G6P concentration was 2mM



The inhibition by ATP with respect to NADP and G6P was also competitive (Fig. 6A, B). The secondary plots give a straight line when the slopes are plotted versus ATP concentration. The inhibition constants are 7.6mM when NADP was the variable substrate and 5.2mM when G6P was the variable one. 5mM Mg⁺⁺ has no effect on the inhibition by adenine nucleotides.

Figure 6A — Inhibition of glucose 6-phosphate dehydrogenase by ATP. NADP concentration was 0.3mM

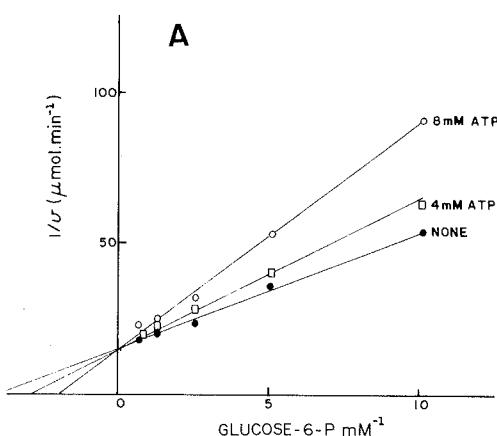
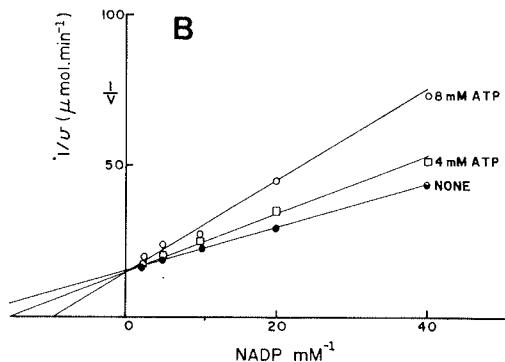


Figure 6B — Inhibition of glucose 6-phosphate dehydrogenase by ATP. G6P concentration was 2mM



Discussion

The procedure described for the isolation of glucose phosphate dehydrogenase from *Polyporus circinatus* gave an overall purification of 209 fold in relation to the centrifuged extract. There was no evidence of the presence of more than one protein in the electrophoresis on polyacrylamide gel. The result from sodium dodecylsulfate-urea polyacrylamide gel electrophoresis suggests that the G6P dehydrogenase from *Polyporus circinatus* is similar to that isolated from *Penicillium* (14) and distinct of glucose 6 phosphate dehydrogenase of other organisms which are commonly oligomers composed of peptide chains of 60.000 daltons (2). The reaction catalyzed by most of G6P dehydrogenase obeys an ordered sequential mechanism with NADP binding before G6P and NADPH released last (18, 16, 11). In any case the reverse reaction could not be determined since the 6 phosphogluconolactone is highly unstable in aqueous solution (9). However the only kinetic analysis performed with a G6P dehydrogenase isolated from mold (14) indicated that a different mechanism could be operative. In the present case the competitive pattern of inhibition by NADPH is consistent with a rapid equilibrium random mechanism, similar to that observed with the *Penicillium* enzyme (14).

The competitive nature of inhibition by ADP and ATP observed with respect to G6P and NADP may be explained as an interaction of the nucleotide with free or binary complex forms of the enzyme. It seems that the inhibitor binds reversibly to an alternative site modifying the interaction of substrate and coenzyme.

The high Ki values for ADP and ATP suggest that the NADPH may be the most important physiological inhibitor of the enzyme although less effective than for the enzyme from *Penicillium* (3).

Acknowledgements

This research was supported by Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

References

1. Avigad, G. — Inhibition of glucose 6 phosphate dehydrogenase by adenosine 5' triphosphate. Proc. Natl. Acad. Sci., 56:1543-1547, 1966.
2. Bonsignore, A. & DeFlora, A. — Regulatory properties of glucose 6 phosphate dehydrogenase. p. 21-62. In: B. Horecker & E. Stadtman, ed. — Current topics in cellular regulation. New York, Academic Press, 1972, vol. 6.
3. Broad, T.E. & Shepherd, M.G. — Purification and properties of glucose 6 phosphate dehydrogenase from the thermophilic fungus *Penicillium dupontii*. Biochim. Biophys. Acta., 198:407-414, 1970.
4. Cleland, W.W. — Multireactant kinetics: nomenclature and rate equations. Biochim. Biophys. Acta., 67:104-134, 1963.
5. Funayama, S. & Zancan, G.T. — Purification and properties of pyridine nucleotide independent L-lactate dehydrogenase from *Polyporus circinatus*. J. Bacteriol., 119:1000-1005, 1974.
6. Glaser, L. & Brown, D.H. — Purification and properties of D-glucose 6 phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem., 216:67-79, 1955.
7. Gomes, T.P. & Zancan, G.T. — Some properties of glucose 6 phosphate dehydrogenase from *Polyporus circinatus*. Arq. Biol. Tecn. (Brasil), 17:103-108, 1974.
8. Horecker, B.L. & Kornberg, A. — The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. J. Biol. Chem., 175:385-390, 1948.
9. Horecker, H.L. & Smyrniotis, P.Z. — Reversibility of glucose 6 phosphate oxidation. Biochim. Biophys. Acta., 12:98-102, 1963.
10. Horne, R.N.; Anderson, W.B. & Nordlie, R.C. — Glucose dehydrogenase activity of yeast glucose 6 phosphate dehydrogenase. Inhibition by adenosine triphosphate and other nucleoside 5' triphosphate and diphosphate. Biochem. J., 9:610-616, 1970.
11. Kanji, M.I.; Toews, M.L. & Carper, W.R. — A kinetic study of glucose 6 phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem., 251:2258-2262, 1976.
12. Kosow, D.P. — Glucose 6 phosphate dehydrogenase of human blood platelets. Kinetics and regulatory properties. Arch. Biochem. Biophys., 162:186-193, 1974.
13. Lowry, O.H.; Rosebrough, A.; Farr, A.L. & Randall, R.J. — Protein measurements with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275, 1951.
14. Malcolm, A.A. & Shepherd, M.G. — Purification and properties of *Penicillium* glucose 6 phosphate dehydrogenase. Biochem. J., 128:817-831, 1972.
15. Markus, Z.; Miller, G. & Avigad, G. — Effect of culture conditions on the production of D-galactose oxidase by *Dactylium dendroides*. App. Microbiol., 13:685-693, 1965.
16. Olive, C.; Geroch, M.E. & Levy, H.R. — Glucose 6 phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Kinetic studies. J. Biol. Chem., 246:2047-2057, 1971.
17. Schales, O. & Schales, S. — A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids. J. Biol. Chem., 140:879-884, 1941.
18. Soldin, S.J. & Balinsky, D. — The kinetics properties of human erythrocyte glucose 6 phosphate dehydrogenase. Biochem., 7:1077-1082, 1968.

**Escherichia coli enterotoxigênica
isolada de lactentes
em Manaus, Amazonas, Brasil***

Loren G. Giugliano**
Gerson S. Nakagima**
Rodolfo Giugliano***
& Roger Shrimpton****

Resumo

Coproculturas e exames parasitológicos foram realizados em 72 lactentes, escolhidos ao acaso, de um bairro pobre de Manaus-Amazonas. Isolou-se 12 amostras de *E. coli* enteropatogênica, uma de *Shigella sonnei*, duas de *Salmonella* sp. e verificou-se a ocorrência de sete casos com *Giardia lamblia*. Trezentas e sessenta cepas de *E. coli* foram submetidas aos testes para verificação da produção de enterotoxina LT e ST. Demonstrou-se a ocorrência de dois casos de portadores de *E. coli* enterotoxigênica sendo que, em um dos casos, as cepas isoladas foram capazes de produzir ambas as enterotoxinas e, no outro, somente enterotoxina ST.

Summary

Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from infants in Manaus, Amazonas

The feces of 72 infants from households randomly selected in a poor district of Manaus, were subjected to parasitological and bacteriological examinations. Twelve enteropathogenic *Escherichia coli*, two *Salmonella* sp., one *Shigella sonnei* and seven *Giardia lamblia* were identified. Three hundred and sixty strains of *E. coli* were tested for production of ST and LT enterotoxin. Two asymptomatic carriers of enterotoxigenic *E. coli* were identified, one of which carried enterotoxigenic *E. coli* capable of producing both LT and ST enterotoxin, while the other carried enterotoxigenic *E. coli* capable of producing only ST.

Introdução

A importância da diarréia infantil, como causa de morte, tem sido muito enfatizada por numerosos autores (11). Nos trópicos, as doenças diarréicas contribuem para a maior parte dos óbitos, das elevadas taxas de mortalidade infantil. Em Manaus, no ano de 1975, o número de óbitos causados por enterites e outras doenças diarréicas foi aproximadamente duas vezes maior do que aquele causado pelas demais doenças infecciosas e parasitárias (5).

A etiologia das diarréias agudas vem sendo estudada desde o começo do século. Nos anos

50, as atenções foram voltadas para *Escherichia coli*, estabelecendo-se que alguns sorotipos são capazes de causar diarréia em crianças até dois anos de idade. No fim da década de 60, os conhecimentos sobre *E. coli*, como agente enteropatogênico, estavam ainda limitados a poucos sorotipos rigidamente estabelecidos mas escassamente entendidos, no que se refere ao mecanismo de patogenicidade.

Nos últimos 10 anos, novos e importantes estudos mostraram que *E. coli* é capaz de provocar diarréia, entre outros mecanismos, pela produção de duas toxinas. A primeira, a enterotoxina termo-lábil (LT) apresenta o mesmo me-

* Financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

** Departamento de Doenças Gastrointestinais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

*** Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Hospital de Moléstias Tropicais, Manaus.

**** Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

canismo de ação da enterotoxina colérica ou seja, atua ativando a enzima adenil-ciclase, que desdobra ATP em AMP cíclico (14); a segunda, a enterotoxina termo-estável (ST), parece atuar no sistema de ciclização do GMP (Richard L. Guerrant, comunicação pessoal).

E. coli enterotoxigênica foi encontrada no México (2), Bangladesh (16), Estados Unidos da América (10), Java Central (17) e Índia (13). No Brasil foi isolada pela primeira vez, por Giugliano (6), em São Paulo e por Guerrant (9), em Florianópolis, SC. Recentemente, Simões & col. (20) e Serafim (18) relataram a ocorrência de *E. coli* enterotoxigênica, em São Paulo, tanto de origem humana como animal.

Este trabalho complementa publicações anteriores (7, 19) e foi realizado com o intuito de estudar a etiologia das doenças diarréicas em crianças de 0 a 1 ano de idade, de um bairro de Manaus e verificar a ocorrência de cepas de *E. coli* enterotoxigênica na população.

Material e Métodos

As amostras de *E. coli* foram isoladas de coproculturas de crianças de 0 a 1 ano de idade. As fezes foram coletadas mediante visita às casas das crianças, residentes em um bairro pobre de Manaus, Amazonas. As mães ou responsáveis eram inquiridas sobre o comportamento intestinal da criança no momento da visita e recebiam um frasco contendo solução conservadora de fezes (Clurman) e eram também instruídas sobre o procedimento da coleta de fezes. No prazo máximo de 24 horas, o material era conduzido ao laboratório para o exame bacteriológico, segundo os métodos recomendados por Edwards & Ewing (3).

As coproculturas eram examinadas quanto à presença de espécimes de *Shigella*, *Salmonella* e *E. coli* enteropatogênica. Pelo menos cinco colônias de *E. coli*, após identificação por provas bioquímicas e sorológicas, eram estocadas em agar inclinado, até o momento da verificação da capacidade em produzir enterotoxina ST e LT. Os soros OB foram adquiridos da Difco Laboratories e os testes para detecção de enterotoxina ST foram realizados utilizando-se a inoculação intragástrica em camundongos recém-nascidos, segundo o método recomendado por Dean & col. (1).

As amostras de *E. coli*, que apresentaram a relação peso dos intestinos/peso dos corpos (PI/PC) entre 0,07 e 0,09, foram submetidas a novos testes, para confirmação dos resultados.

A produção de enterotoxina LT foi verificada pelo método recomendado por Guerrant & col. (8), com cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO).

As amostras de *E. coli*, isoladas de um mesmo caso, foram semeadas conjuntamente em 4ml de Trypticase Soy Broth (Difco) com 0,6% de extrato de levedura, em tubos de ensaio e incubados a 37°C por 48 horas, com agitação constante. As culturas foram, em seguida, centrifugadas a aproximadamente 4.000r.p.m. por 40 minutos e o sobrenadante filtrado em Millipore 0,45 micra (Millipore Bedfore Corporation). Vinte microlitros do sobrenadante estéril foram utilizados na inoculação das células CHO.

As células CHO foram fornecidas por Dr. Richard L. Guerrant, do Departamento de Medicina da Universidade de Virgínia, USA e foram mantidas em F-10 Ham Medium (Difco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Difco), 100U por ml de penicilina G potássica e 100mcg/ml de estreptomicina.

Para a realização do teste, as células de um frasco de aproximadamente 30cm² de superfície foram tripsinadas e 0,25ml desta suspensão foram colocados em 24,75ml de F-10 com 1% de soro fetal bovino e antibióticos. Desta última suspensão, 0,25ml foram colocados em cada uma das 96 câmaras do "microliter tissue-culture plate" (Cooke Laboratory Products, Alexandria, Virgínia) e em seguida adicionados os 20 microlitros dos sobrenadantes, estérveis, das culturas de *E. coli*.

Amostras de fezes foram também coletadas para exame parasitológico, segundo o método da centrífugo-flutuação, recomendado por Faust (4), para verificação de parasitas potencialmente causadores de distúrbios diarréicos.

Resultados

Foram estudadas 72 crianças, das quais 25 (34,7%) apresentavam diarréia no momento da coleta (referida pela mãe ou responsável) e 47 (65,3%) não mostrava sintomatologia gastrointestinal.

Vinte e uma (84%) das 28 crianças diarréicas e 28 (59,5%) das 47 crianças normais tinham relato de diarréias anteriores ao do momento da visita.

Pelos exames parasitológicos e coproculturas, foram determinados os prováveis agentes etiológicos em 36% das diarréias estudadas.

Nas fezes das crianças normais, foram encontrados patógenos em 27,6% dos casos (Tabela 1).

Tabela 1 — Patógenos encontrados nos exames parasitológicos e bacteriológicos de fezes de crianças diarréicas e normais

Estado das crianças	Patógenos	
	Bactérias	Parasitas
Diarréico (25)*	<i>E. coli</i> 026 <i>E. coli</i> 086 <i>E. coli</i> 0111 <i>E. coli</i> 0119 <i>E. coli</i> 0126 (2)* <i>Shigella sonnei</i>	<i>Giardia lamblia</i> (2)*
Normal (47)*	<i>Salmonella</i> sp (2)* <i>E. coli</i> 086 (2)* <i>E. coli</i> 0111 <i>E. coli</i> 0126 <i>E. coli</i> 0127 <i>E. coli</i> 0128	<i>Giardia lamblia</i> (5)*

* N.º de casos

De 360 cepas de *E. coli*, examinadas quanto à produção de enterotoxina ST e LT, cinco cepas isoladas de dois casos de fezes normais apresentaram a relação PI/PC superior a 0,09, ou seja foram produtoras de enterotoxina ST. De 14 casos, 29 cepas apresentaram a relação PI/PC entre 0,07 e 0,09, o que, segundo os autores da metodologia utilizada, podem ser consideradas como cepas suspeitas (Tabela 2).

Tabela 2 — Resultados dos testes em camundongos recém-nascidos realizados com sobrenadantes de amostras de *E. coli* isoladas de crianças diarréicas e normais

Crianças Estudadas	PI/PC** > 0,09		0,09 > PI/PC > 0,07	
	N.º de casos	%	N.º de casos	%
Diarréicas (25)*	—	--	9	36,0
Normais (47)*	2	4,2	5	10,6
Total (72)*	2	2,7	14	19,4

* N.º de casos

** Relação entre o peso dos intestinos e o peso dos corpos

Em apenas um dos 72 casos estudados foi constatada a capacidade das cepas de *E. coli* em produzir enterotoxina LT. Estas cepas foram isoladas de uma criança normal e foram também capazes de produzir enterotoxina ST.

Discussão

A determinação dos agentes etiológicos das diarréias infecciosas é de grande importância, do ponto de vista epidemiológico, de controle e tratamento.

Este trabalho mostra a gravidade do problema das doenças entéricas na região estudada, pois 34,7% de crianças, escolhidas ao acaso, na limitada faixa etária de 0 a 1 ano de idade, apresentavam diarréia no momento do estudo e 68% relatavam episódios anteriores da doença. Isto se torna mais evidente quando estimamos que as condições de saneamento, abastecimento de água e nível sócio-econômico das famílias estudadas é semelhante em aproximadamente 30% da população de Manaus.

Apesar da alta incidência de diarréia na região, poucos estudos sobre o assunto têm sido realizados. A ocorrência de bactérias toxigênicas, na Amazônia, era, até o presente estudo, desconhecida. Este trabalho mostra que *E. coli* toxigênica pode ser encontrada numa população de lactentes, porém a importância e a frequência de tais germes não se mostram claramente, uma vez que as cepas de *E. coli* toxigênica foram todas isoladas de crianças normais. Novos estudos são necessários para melhor caracterização.

Vários autores têm encontrado amostras de *E. coli* enterotoxigênica em indivíduos normais. Donta & col. (2) encontraram *E. coli* toxigênica capaz de produzir enterotoxina LT e ST em crianças mexicanas normais, porém nenhuma das cepas foi capaz de produzir somente enterotoxina ST. Em nosso estudo, houve cepas de *E. coli* capazes de produzir enterotoxina ST mas não LT. Sack & col. (15) reportaram, pela primeira vez, amostras de *E. coli*, de origem humana, produtoras de enterotoxina ST somente, porém isoladas de adultos portadores da chamada "diarréia dos viajantes". Serafim & col. (18), em São Paulo, e Sack & col. (16), em Dacca, também encontraram tais germes, em casos de diarréia humana. Mas os autores não deixam claro se isoladas de adultos ou de crianças.

Segundo Dr. Richard L. Guerrant (comunicação pessoal), enterotoxina ST tem pouca im-

portância como causa de diarréia em crianças, pois as amostras são encontradas na mesma proporção, em crianças normais e diarréicas. Ao contrário, tais cepas parecem ser causa importante de diarréias em adultos.

Alta porcentagem (19,4%) de nossas amostras apresentou a relação PI/PC entre 0,07 e 0,09, ao contrário do relatado por Donta & col. (2). Em seus estudos, nenhuma das amostras mostrou a relação PI/PC nos valores mencionados.

As amostras de *E. coli* produtoras de enterotoxina LT parecem ser importante causa de

diarréia, tanto em adultos como em crianças, apesar de já terem sido isoladas de indivíduos normais (12).

Agradecimentos

Agradecemos a Ana Maria de Souza Lira e Maria da Graça Palmeira Bernardi, pela colaboração nos trabalhos técnicos. Agradecemos também ao Dr. Richard L. Guerrant, pelo auxílio na elaboração do teste para detecção da enterotoxina LT, com células CHO.

Referências Bibliográficas

1. Dean, A.G.; Ching, Y.C.; Williams, R.G. & Harden, L.B. — Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1972.
2. Donta, S.T.; Wallace, R.B.; Whipp, S.C. & Olarte, J. — Enterotoxicogenic *Escherichia coli* and diarrheal disease in Mexican children. *J. Infect. Dis.*, 135:482-485, 1977.
3. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. — Identification of Enterobacteriaceae. 3rd. ed. Minneapolis, Minnesota, Burgess Publishing, 1972.
4. Faust, E.C.; Sawitz, W.; Tobie, J.; Adan, V.; Peres, C.F. & Lincicome, D.R. — Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. *J. Parasit.*, 25:241-262, 1939.
5. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil, 1976. p. 121.
6. Giugliano, L.G. — Produção de enterotoxina LT por amostras de *Escherichia coli*. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1976. (Tese de Mestrado).
7. Giugliano, L.G.; Giugliano, R. & Pinheiro, M.F.S. — Bactérias enteropatogênicas em lactentes de um bairro de Manaus-Amazonas. *Acta Amazônica*, 7:395-400, 1977.
8. Guerrant, R.L.; Brunton, L.L.; Schnaitman, T.C.; Rebhun, L.I. & Gilman, A.G. — Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 10:320-326, 1974.
9. Guerrant, R.L.; Moore, R.A.; Kirschenfeld, P.M. & Sande, M.A. — Role of toxicogenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. *Engl. J. Med.*, 293:567-573, 1975.
10. Guerrant, R.L.; Dickens, M.D.; Wenzel, R.P. & Kopian, A.Z. — Toxicogenic bacterial diarrhea: nursery outbreak involving multiple bacterial strains. *J. Pediatr.*, 89:885-891, 1976.
11. Organización Panamericana de la Salud. Estudios y estrategias necesarios para reducir la morbilidad y mortalidad por infecciones entéricas. Discusiones Técnicas: Publicación Científica, 302:1-64, 1975.
12. Pickering, L.K.; DuPont, H.L.; Evans, D.G.; Evans, D.J. & Olarte, J. — Isolation of enteric pathogens from asymptomatic students from the United States and Latin America. *J. Infect. Dis.*, 135:1003-1009, 1977.
13. Sack, B.R.; Gorbach, S.L.; Banwell, J.G.; Chatterjee, B.D. & Mitra, R.C. — Enterotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from patient with severe cholera-like disease. *J. Infect. Dis.*, 123:378-385, 1971.
14. Sack, B.R. — Human diarrheal disease caused by enterotoxicogenic *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 29: 333-353, 1975.
15. Sack, D.A.; Merson, M.H.; Wells, J.G.; Sack, B.R. & Morris, G.K. — Diarrhea associated with heat-stable enterotoxin-producing strains of *Escherichia coli*. *Lancet*, 2:239-241, 1975.
16. Sack, D.A.; McLaughlin, J.C.; Sack, B.R.; Ørskov, F. & Ørskov, I. — Enterotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from patients at a hospital in Dacca. *J. Infect. Dis.*, 135:275-280, 1977.
17. Sebodo, T.; Soenarto, Y.; Rohde, J.E.; Ryan, N.J.; Taylor, B.J.; Luke, R.J.K.; Bishop, R.F.; Barnes, G.L.; Holmes, I.H. & Ruck, B.J. — Etiology of diarrhea in children aged less than two years in Central Java. *Lancet*, 1:490-491, 1977.
18. Serafim, M.B.; Castro, A.F.P.; Rangel, H.A. & Neto, L.P. — Isolation of heat stable enterotoxin-producing strains of *Escherichia coli* isolated from cases of diarrhea in Campinas, SP, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. (São Paulo)*, 19:144-147, 1977.
19. Shrimpton, R. & Giugliano, R. — Nutrição em lactentes de um bairro de Manaus, Amazonas. *Acta Amazônica*, 7:247-253, 1977.
20. Simões, M.; Serafim, M.B.; Rodrigues, A.C.; Giorgi, W.; Netto, L.P. & Castro, A.F.P. — Amostras de *Escherichia coli*, de origem animal produtoras de enterotoxina termoestável (ST) isoladas de casos de diarréia em São Paulo, SP, Brasil. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 8:143-144, 1977.

Pleospora raetica (loculoascomycetes) in culture*

Elza A. de Luna**
& João S. Furtado***

Summary

A fungus isolated from plant debris and identified as *Pleospora raetica* Muller grows easily in Petri dishes with cornmeal agar, potato dextrose agar and V8-agar at 25°C. The lifecycle is completed within 15 to 20 days, with the ascogenous system appearing in the sixth day. Vegetative structure is represented by elongated hyphae, with septa either at short or long distances, multinucleate segments at the early stages, but uni or binucleate later on; or globose, catenulate cells, multinucleate at first and uni or binucleate afterwards, if potato dextrose agar is used. Nuclear exchange is intensive, as a consequence of abundant hyphal anastomosis. Pseudothecia are uniloculate ascostromata, predominantly sunken into the agar medium. The ascogenous system reveals croziers and develop into bitunicate, ovate or obovate asci containing 8 muriform ascospores. Monosporic culture reveals the homothallic pattern or sexuality. Ascospore germination is precocious and occurs before the ascospore leaves the ascus. Uncleaved asci may germinated with its contents resembling a single giant ascospore. Asexual spores have not been observed.

Resumo

Pleospora raetica (loculoascomiceto) em cultivo

Fungo isolado de fragmentos vegetais e identificado como *Pleospora raetica* Muller cresce facilmente em placas de Petri contendo agar-fubazinho, batata-dextrose-agar e agar-V8, a 25°C. O ciclo de vida é completado entre 15 a 20 dias, sendo que já no 6º dia surgem células do sistema ascógeno, com croziers. As estruturas vegetativas são representadas por hifas alongadas, com septos a curta ou longa distância, formando segmentos multinucleados, nas primeiras fases, porém uni a binucleados, nos estágios posteriores. Quando batata-dextrose é utilizado, surgem células globosas, catenuladas, inicialmente multinucleadas, mas posteriormente uni ou binucleadas. A transferência de núcleos é intensa, devido às abundantes anastomoses hifais. Os pseudotécios são ascostromas uniloculares, predominantemente imersos no meio de agar. Os ascos bitunicados são ovados ou subovados, contendo 8 ascosporos muriformes. Culturas monosporicas revelam tratar-se de espécies homotálica. A germinação dos ascosporos é fácil, podendo ocorrer mesmo antes de serem ejetados do interior do ascus. Ascus sem clivagem citoplasmática, na formação dos ascosporos, podem exibir germinação precoce, como se todo o citoplasma constituisse o único, gigante ascosporo. Não foram observados esporos assexuados.

Introduction

Pleospora raetica Müller produces pseudothecia containing bitunicate asci. Saprobic on dead leaves and on plant debris, when in nature, its imperfect stage, as member of the form-genus *Stemphylium*, may cause phytopathological problems (12, 27). Taxonomically, the species needs to be better interpreted, since in the Americas it is still referred to as the *Pleospora raetica-Pleospora richtophensis* complex (38).

Material isolated in Recife, PE, Brazil and since then identified as *P. raetica* was tested on several media, and routinely studied on three, to provide data on hyphal growth, pseudothecial development, spore germination, and sexual pattern, the latter feature as defined by Raper (23). Ascosporogenesis and centrum differentiation had to be postponed due to problems with techniques to reveal nuclear details.

* Part of the MSc thesis of E.A. de Luna, submitted to Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

** Present address: Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, 50000 Recife, PE, Brazil.

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

Material and Methods

The fungus was originally isolated from plant debris, in Recife, PE, Brazil and identified as *P. raetica*. Stock cultures are maintained in cotton-plugged test-tubes with potato-dextrose-agar (PDA), kept in air-conditioned room and generally transferred every three months. The sample is filed under number 2350, Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Recife, PE.

Preliminary tests were done on PDA, potato-agar (PA), cornmeal-agar (CMA), potato-carrot-thiamine (PCT), Sabouraud (simple and yeast extract enriched), malt-potato-agar nr. 5 (MPA5) for both perfect and imperfect forms, and Campbell's V-8 juice-agar (V8-agar). Of these, PDA, CMA and V8-agar were routinely used.

The colony is started from an inoculum placed on the centre of the agar surface in a Petri-dish, encircled by autoclaved, 1.0cm squares of dialysis membranes, placed 0.5cm apart from the inoculum. As the colony grows and surpasses the membranes, the squares are removed for processing at the following time intervals: 0-72h, 72h-6 days, 6-9 days, 9-12, 12-15, 15-20, 20-30, and 30-40 days. Alternatively, new membranes are deposited on the agar surface as the colonized substrates are removed. Or — instead of using the membrane technique — the fungus is inoculated on the four edges of an agar block placed over a glass slide which is then topped by a coverslip and kept in a Petri-dish converted into a moist chamber.

Preparations for optical microscopy are mounted with lactophenol-cotton blue (7), alcoholic toluidine blue (10) or HCl-Giemsa technique (9). In the later case, the hydrolysis time is adjusted to 10min at room temperature and 15min at 60-63°C, whenever aged or thick-walled structures are involved.

For the study of the fruiting stage the same culture and staining procedures are adopted. Pseudotrichia are handled with sharp needles and forceps and transferred to a drop of the mounting media on a glass slide, followed by teasing apart of the components and placement of a coverslip for examination under the microscope. When necessary, further pressure is exerted with the help of a wooden matchstick or a pencil eraser.

Sexual pattern is determined from single spore cultures prepared from spore suspension, plating, monitoring and subsequent transfer of

germinating spore to pure monosporic growth. Alternatively, results are achieved from cultures deriving from spores ejected on the surface of a clean medium in a Petri-dish base inverted over a sporulating colony.

For descriptive purpose, the colony formed in a Petri-dish is characterized into arbitrarily conventional regions: (i) the growing or advancing region, which represents the outermost hyphal elements of the colony border; (ii) the median region, starting right after the advancing area and extending towards the neighbourhood of the colony centre; (iii) the adjacent region, formed by the mycelium surrounding the inoculum; and (iv) the inoculum properly.

Results

An inoculum placed on the centre of a Petri-dish grows to form a circular colony that covers the entire surface of the agar medium within 40 days. If on PDA, the color is dark-green or black, whereas on CMA or V8-agar it is light-brown or dark-brown. As the hyphae grow and sink into the agar medium, the use of membrane support makes the observation easier.

The hyphae in the growing margin are predominantly hyaline, monopodial or dichotomous, coexisting with shorter elements that result from septation at closer distances. Their numerous nuclei per cell (Fig. 1) show either com-

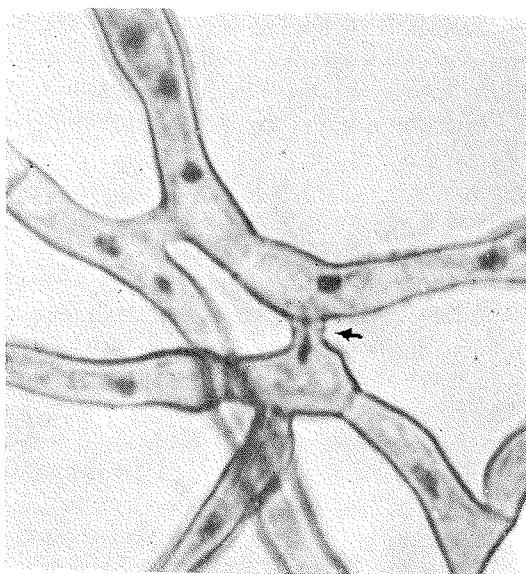
Figure 1 — Growing region; vegetative mycelium with prevalence of monopodial, elongate hyphae. 72h growth on PDA with dialysis membrane. HCl-Giemsa staining. 120x



pacted or granulous chromatinic material. This aspect persists during colonial growth.

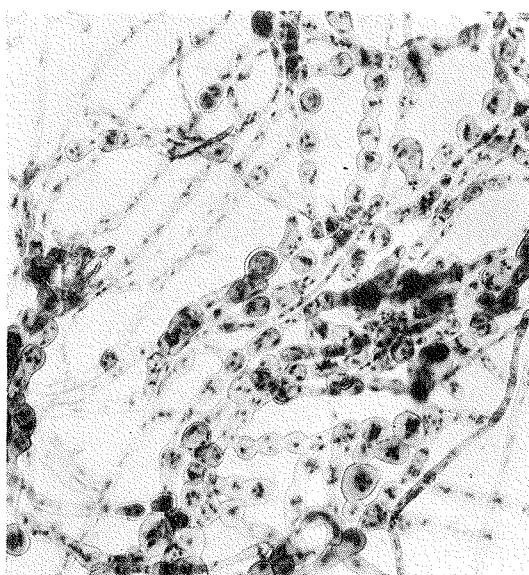
The medium region shows greater cell diversity. When on CMA or V8-agar, the hyphae are formed by short-elongate segments, multinucleate at first 72h and simultaneously changing to anastomosed, uni or binucleate cells (Fig. 2).

Figure 2 — Median region; multinucleate anastomosing cells with one migrating nucleus (arrow). 72h growth on CMA with dialysis membrane. HCl-Giemsa staining. 1750x



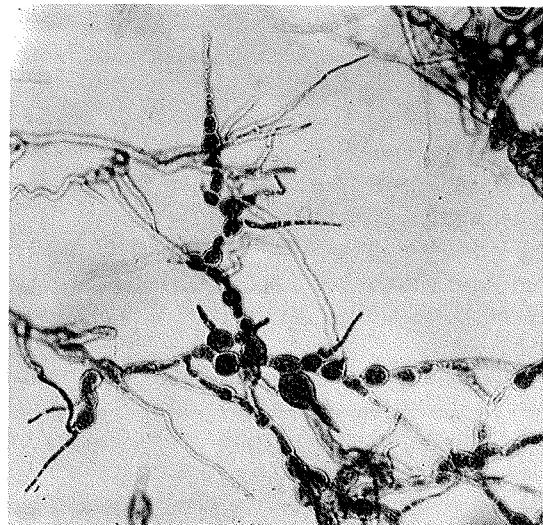
If PDA is employed, globose, often catenulate cells prevail, multinucleate at first, and progressively converted into short-elongate, uni or binucleate elements after six days (Fig. 3). When

Figure 3 — Median region; globose segments resulting from septation at short distances. 72h growth on PDA with dialysis membrane. HCl-Giemsa staining. 270x



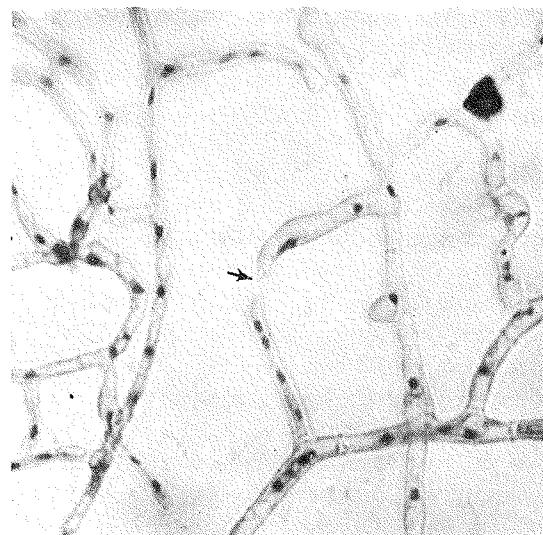
growing over the dialysis membrane, the globose cells produce hyaline, filiform outgrowths composed of 1-3 uninucleate cells (Fig. 4) after six days.

Figure 4 — Median region; globose cells with short-septate filiform branches. 6 days growth on PDA dialysis membrane. Lactophenol cotton blue staining. 260x



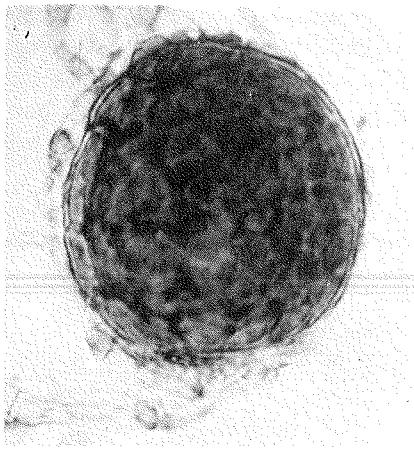
Intensive hyphal anastomosis leads to mycelial reticulation (Fig. 5), a feature more prominent towards the inoculum. This region, however, soon tends to harden, with the hyphae losing their identity. After 15 days, the region of the inoculum shows tufts of hyaline, aerial, thin-walled hyphae emerging from the immersed mycelium.

Figure 5 — Median region; vegetative hyphae with abundant branchings and anastomosis (arrow). Cells both multi or binucleate. 12 days growth on CMA with dialysis membrane. HCl-Giemsa staining. 270x



Pseudothecia are abundantly produced, immersed into the medium or over the dialysis membrane, and appear either individually or grouped. If CMA or V8-agar are used, they may reach the growing margin while on PDA the fruiting is restricted up to the median region. With the help of membrane support, pseudothecia appear as unilocular, usually globose, 100-200 μ m in diam., carbonaceous and heavily pigmented ascostromata (Fig. 6). When immersed, dehiscence usually occurs through unlocalized bursting. If erruptive or on membrane support, liberation of ascospores takes place through an ostiole.

Figure 6 — Globose pseudothecium from non-identified region. 12 days growth on CMA. 600x



The origin of the fruiting structure is not known with certainty yet, but some structures and processes deserve special comments. In spite of the lack of sufficient evidence for sexual behavior, the globose cells produced on PDA and provided with the filiform outgrowths might be related to pseudothecial origin, due their morphological similarity to trichogynous elements. Nonetheless, neither anastomosis, nor nuclear transfer are seen; pseudothecia are produced whether such elements are present or not; and no evidence of either antheridia or ascogonia is available. Other possible structures involved in pseudothecial origin are represented by fusion between uni or binucleate globose cells (Fig. 7); short-pedicelate budding (Fig. 8), with sequential fusion of adjacent cells (Fig. 9) followed by knitting of the surrounding hyphae; or cell division into segments which develop into a multihyphal pattern. However, there is no cytological evidence, at the chromosomal level, to support any of those assumption yet.

Figure 7 — Median region. Presumptive pseudothecial origin (arrow) from cell fusion. 72h growth on CMA with dialysis membrane. HCl-Giemsa. 1640x

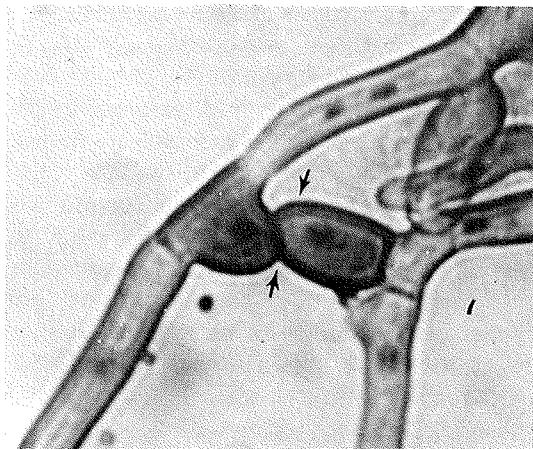


Figure 8 — Median region. Cell budding (arrow) suggestive of pseudothecial differentiation. 9 days growth on CMA with dialysis membrane. Lactophenol-cotton blue staining. 1620x

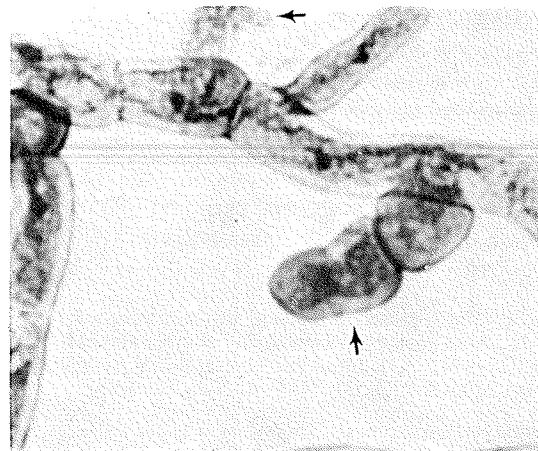
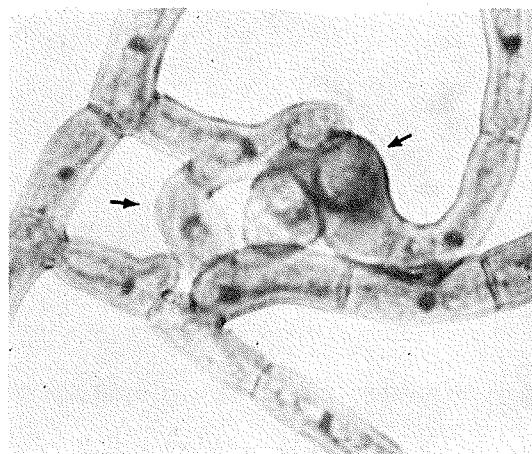


Figure 9 — Median region; branching and knitting, as part of the origin of pseudothecial primordium. 9 days growth on CMA with dialysis membrane. Lactophenol-cotton blue staining. 1620x

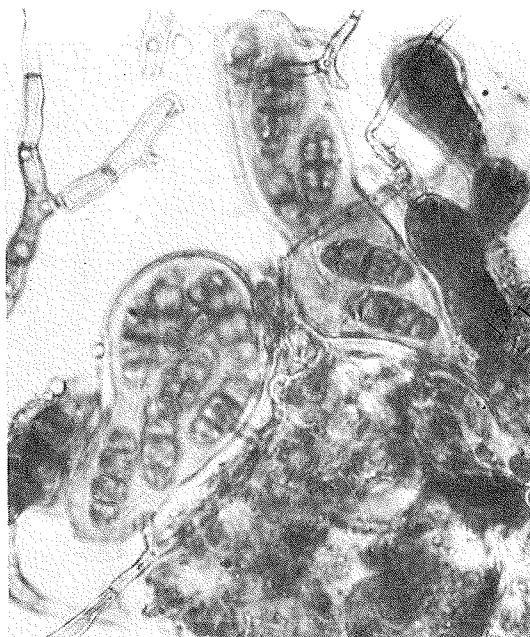


Regardless of more precise markers during pseudothecial development, the following stages may be discernable: *pseudothecial primordium*, if the structure lacks either ascogenous elements or any other component suggestive of the ascus line; *juvenile pseudothecium*, if ascogenous cells are present; and *mature pseudothecium*, when asci with ascospores are found.

The production of fruiting structures varies according to the medium used, and there is a delay in maturation when PDA is compared to CMA or V8-agar. *Pseudothecial primordia* appear within 48h in both adjacent and inoculum regions; or within 72h in the median area, in any of the three media employed. *Juvenile pseudothecia* are found: after 9-12 days in the median and adjacent regions, on CMA and V8-agar; or 15-20 days, on PDA. *Mature pseudothecia* are seen after 9-12 days in the inoculum, and 12-15 days in both median and adjacent regions, on CMA and V8-agar; but only 12-15 days in the inoculum and 20-30 days in median and adjacent regions, if PDA is used. Time intervals are determined in cultures yielded from the original isolate source, except for the inoculum region which is given by colonies grown from monoascosporic isolation.

The ascus rosettes are usually composed by up to 13 bitunicate asci showing the typical "Jack-in-the-box" or physoclastic behavior (Fig. 10). The eight-spored condition prevails,

Figure 10 — Partial contents of crushed pseudothecium with asci at distinct differentiation stages, including one showing the "Jack-in-the-box" behavior. 30 days growth on PDA. 650x

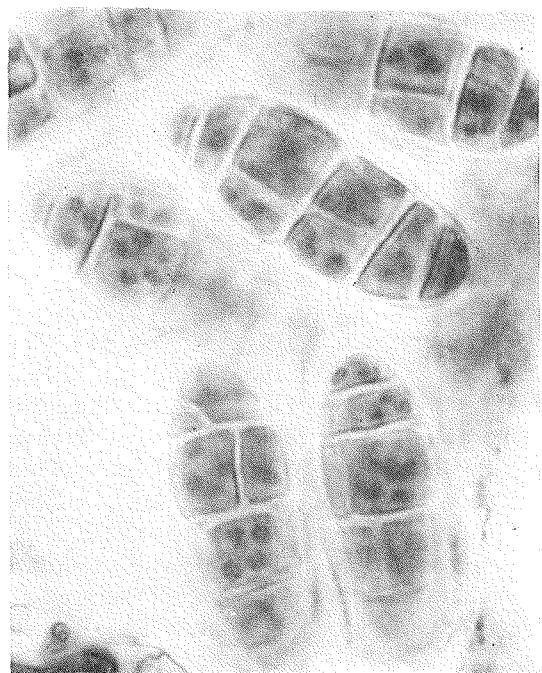


though monoascosporic isolates may show asci with 2-7 spores. At the pre-elongation stage, the ovate or obovate asci range within 25-62x37-95 μ m. During spore liberation the ascospore base measures 116-165 μ m long by 19-51 μ m wide, and the elongated portion 18-43 μ m long.

The origin and differentiation of both ascus and ascospore yet remain to be fully investigated, due to technique limitation. Mature ascospores are oblong or elliptic, 25-36x12-14 μ m, multicelled and result from 3-6 transversal and 2-4 longitudinal septa, delimitating multinucleate cells (Fig. 10).

Ascospores germinate readily, whether on agar surface, dialysis membrane, the inner face of the Petri-dish lid or the test-tube wall. With spore suspension platings, germination occurs within 6-24h, through the production of 1-5 germtubes emerging singly or in pairs from each ascospore cell (Fig. 11). An emerging papilla is soon delimited from the cell by a cross-septum and the numerous germtubes grow into a multihyphal proliferating system.

Figure 11 — Multicelled, heavily pigmented mature ascospores with numerous nuclei per cell. 15 days growth on CMA. HCl-Giemsa staining. 170x

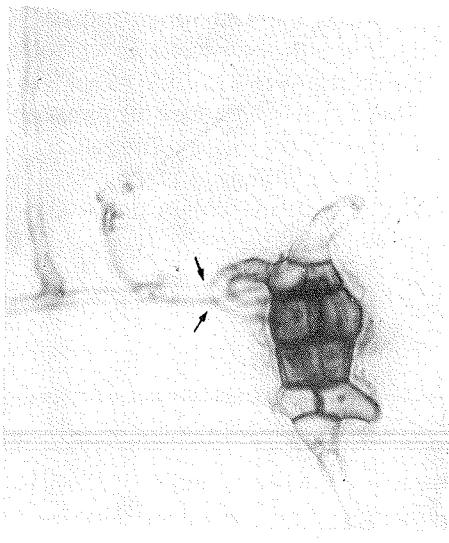


Dormancy is practically non-existent, since spores germinate while still inside the ascus. Not uncommonly, the ascus cytoplasm shows a germinating behavior even before cleavage has led to ascospore differentiation.

Following germination, there is a liberal hyphal fusion, leading to nuclear exchange (Fig. 12) whether the spores have been ejected or are still inside the ascci. The spore-to-spore follow-up, with monoascosporic cultures indicates that the fungus is homothallic.

During 40 days of observation, asexual spores were not seen.

Figure 12 — Multicellular ascospore germinating through different cells and exhibiting precocious hyphal anastomosis, involving contiguous germtubes. 40 days growth on PDA with dialysis membrane. HCl-Giemsa staining. 650x



Discussion

Numerous important aspects of the fruiting structure had to be postponed due to problematical aspects of technique. Nonetheless, the analysis of unstained pseudothecium, ascii and ascospores confirms the similarity of the fungus studied to *Pleospora raetica*, according to most leading authorities on the group (18, 19, 29, 38).

The results are not aimed at taxonomic implications, but it appears that the taxon needs to be yet better established, since in the Americas it has been included in *P. raetica-P. richtophenensis* complex (38)*.

During mycelial growth in culture, there is no morphological differentiation to support the demarkation of distinct regions. Therefore, the recognition of growing, median, adjacent and

inoculum regions has relative significance and provides only a convenient though arbitrary means of description of the spore to pseudothecium cycle.

During mycelial development, the multinucleate cells become reduced to one or two nuclei per segment, a phenomenon that has been reported for other fungi, as the hyphae age (2). The nuclei show variable shapes and, among these, the elongate habit is suggestive of nuclear division (20) or migration (1, 13).

Simultaneous with nuclear reduction, the hyphae undergo an increasing number of cell anastomosis, with predominance of the H-type also reported in the literature and for sites where nuclear transfer occurs (1, 5, 13).

The origin of the fruiting structure has not been interpreted with certainty, but the following presumptive structures and processes may be evoked; fusion of globose cells, followed by cell division, expansion and knitting; cell budding from adjacent segments and knitting; cell division following a multiplan pattern. Of particular interest, however, are the globose, often catenulate cells produced on PDA. Such cells, when on supporting membranes form filiform outgrowths that resemble the structures called trichogynes found in protoperithecia of *Neurospora* (37) and are related to pseudothecium formation, though sexual function has not yet been detected. In *Pseudoplea gaeumanii* such elements were not named as trichogyne, but a similar function was considered (36). In *Didymocrea sadasavanii* the term "trichogyne-like" was coined and, in spite of the difficulty to ascertain its trichogynous function, the fusion of such structure to mycelial hyphae, with possible nuclear migration, was reported (15). Due to the lack of resolution at the chromosomal level in early stages of pseudothelial differentiation, any assurance of trichogynes in the fungus studied becomes only presumptive.

The fully developed pseudothecia produced in culture are typical unilocular ascostromata, characteristic of the bitunicates (4, 18, 21, 22, 25, 30, 39) particularly of *Lepstosphaerulina australis* (11).

Ascal structure and behavior during spore liberation, as seen under the optical microscopy, are similar to the bitunicate type (3, 6, 8, 16, 17, 18), which has been partially interpreted at the ultrastructural level (11, 24). Dehiscence occurs through the physoclastic or stretch-and-crack behavior of the wall (11), and ejection of the as-

* Special thanks are due to Dr. Clark T. Rogerson, The New York Botanical Garden, N.Y., U.S.A., for comments.

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

CONTEÚDO

CONTENTS

Volume 9

Janeiro-Março 1978

Número 1

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

Volume 9

Abril-Junho 1978

Número 2

Clara Pechmann Mendonça & Carlos Solé-Vernin	55	Estafilococos hospitalares	Study of hospitals <i>Staphylococcus</i>
Arléte S. Martini Carlos Solé-Vernin & Elvira M.C. da Silva	62	Aspectos bacteriológicos e epidemiológicos na glomerulonefrite difusa aguda (pós-estreptocócica) de casos esporádicos em Londrina, PR	Bacteriological and epidemiological aspects of acute post-streptococcal glomerulonephritis in sporadic cases from Londrina, PR
D. P. Falcão J. J. Farmer III & V. R. Dowell Jr.	71	Distinção entre <i>Yersinia enterocolitica</i> e de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> frente a antibióticos e quimioterápicos	Differentiation between <i>Yersinia enterocolitica</i> and <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> by using antibiotics and chemotherapeutic agents

A. F. Pestana de Castro O. Campedelli Filho & E. Waisbich	74	<i>Micobactérias oportunistas isoladas de nódulos linfáticos mesentéricos de suínos aparentemente normais em São Paulo, Brasil</i>	<i>Opportunist mycobacteria isolated from the mesenteric lymph nodes of apparently healthy pigs in São Paulo, Brazil</i>
Cenira Vanacor Barroso & A. M. de Jesus Nonato	84	<i>Influência de fatores de crescimento em Chlorella</i>	<i>The influence of growth factors upon Chlorella</i>
F. P. de França & M. C. Yuan	88	<i>Influência da concentração de NaNO₃ na produção de biomassa de Chlorella homosphaera</i>	<i>Influence of the NaNO₃ concentration on the production of Chlorella homosphaera biomass</i>
Fúlvio José Alice	92	<i>Isolamento e caracterização parcial de um tipo de herpesvírus bovino</i>	<i>Isolation and partial characterization of a type of bovine herpesvirus</i>
José M. S. Mezêncio Romain R. Golgher Maria de L. P. Peixoto & Paulo César P. Ferreira	97	<i>Propriedades da interferência causada pelo vírus Marituba</i>	<i>Properties of interference caused by Marituba virus</i>

Volume 9. Julho-Setembro 1978 Número 3

Romain Rolland Golgher José Mário S. Mezêncio Paulo César P. Ferreira & Maria L. Peixoto	103	<i>Interferência causada por arbovírus do grupo C</i>	<i>Interference caused by group C arboviruses</i>
D.P. Falcão W.H. Ewing B.R. Davis & G.J. Hermann	109	<i>Caracterização bioquímica de Yersinia enterocolitica e de Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>A biochemical characterization of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis</i>
Laerte de Andrade & L. Palhano Júnior	122	<i>Interferência do radical nitrito na pesquisa da niacina em culturas de micobactérias</i>	<i>Nitrite radical as interferent in niacin research in mycobacterial cultures.</i>
Leila S. Fonseca & Paulo P. Gontijo Filho	125	<i>Micobactérias atípicas isoladas de material humano na cidade do Rio de Janeiro. I — Identificação preliminar pela morfologia colonial</i>	<i>Atypical mycobacteria isolated from human sources in Rio de Janeiro. 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 fagotipos</i>	<i>Hospital infections caused by <i>Staphylococcus aureus</i> and their respective phage types</i>
Leila S. Fonseca & Paulo P. Gontijo Filho	149	<i>Micobactérias atípicas isoladas de material humano na cidade do Rio de Janeiro. II — Identificação bioquímica e espectro de resistência aos tuberculostáticos</i>	<i>Atypical mycobacteria isolated from human sources in Rio de Janeiro. 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

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

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

Volume 9 Setembro-Dezembro 1978 Número 4

Sinval M. de Melo & José Noronha Péres	169	<i>Pseudomonas aeruginosa de origem hospitalar classificadas pela produção de piocina</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa from hospitalar source classified by pyocin production</i>
Maria H.L. dos Reis Waldely de Oliveira Dias & Luiz R. Trabulsi	177	<i>Degradação de tirosina por amostras de enterobactérias e outros microrganismos Gram-negativos: utilidade da prova</i>	<i>Tyrosine degradation by enterobacteria and other Gram-negative microorganisms: the usefulness of the test</i>
Ilvan D. Ricciardi Paulo C. Sabroza E. Daniel Sandoval & W. Mayrink	181	<i>Estudo soro-epidemiológico da prevalência de toxoplasmose humana no Brasil</i>	<i>Seroepidemiological study on the prevalence of human toxoplasmosis in Brazil</i>
José R.F. Brito Ivone R. Suassuna & Italo Suassuna	188	<i>Sensibilidade de <i>Citrobacter diversus</i> (<i>Levinea malonatica</i>) e <i>Levinea amalonatica</i> a antimicrobianos</i>	<i>Susceptibility of <i>Citrobacter diversus</i> (<i>Levinea malonatica</i>) and <i>Levinea amalonatica</i> to antimicrobial agents</i>
Shigehiro Funayama & Glaci T. Zancan	192	<i>Purificação e estudos cinéticos da glicose 6 fosfato desidrogenase de <i>Polyporus circinatus</i></i>	<i>Purification and kinetic studies of glucose 6-phosphate dehydrogenase from <i>Polyporus circinatus</i></i>
Loren G. Giugliano Gerson S. Nakagima Rodolfo Giugliano & Roger Shrimpton	198	<i>Escherichia coli enterotoxigenica isolada de lactentes em Manaus, Amazonas, Brasil</i>	<i>Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> isolated from infants in Manaus, Amazonas, Brasil</i>
Elza A. de Luna & João S. Furtado	202	<i>Pleospora raetica (loculoascomycetes) em cultivo</i>	<i>Pleospora raetica (loculoascomycetes) in culture</i>
Hermann G. Schatzmayr J.A. Zepeda-Bermudez R.M. Ribeiro Nogueira R. Silveira Azeredo & J. Pereira do Nascimento	210	<i>Isolamento do vírus ECHO 9 de casos de meningite aseptica</i>	<i>Isolation of ECHO 9 virus from cases of aseptic meningitis</i>

Errata*

Artigo "Estafilococos Hospitalares" Rev. de Microbiol., 9(2): 55-61, 1978

Onde se lê

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP,
14100 Ribeirão Preto, SP

Leia-se:

Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto, USP, 14100 Ribeirão Preto, SP

Onde se lê

Summary

Study of hospitals Staphylococcus

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

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

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

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

Leia-se

Summary

Study of Hospital Staphylococci

During the periods 1970-1971 and 1974-1975 specimens from hospital acquired infections processes were collected in a General Hospital of Araraquara, SP, Brazil. Although the incidence of these infections had been in the raise, in the last stages of the study only a few Staphylococci strains were isolated. The etiology of the hospital acquired infections were then nearly due to Gram-negative bacteria. With regard to the Staphylococci strains, we took into account not only their phage-types but, in addition, their antibiograms, the Barber & Burston's patterns of antibiotic sensitivities and their behavior in the presence of Mercuric ion. The isolated strains were resistant to the tested antibiotics. Among the strains isolated in 1975, great variations of the patterns of resistance to the antibiotics appeared, particularly with regard to chloramphenicol, and, as a result, the frequency of Barber & Burston's patterns were altered. The mercuric ion test appeared very important for the recognition of hospital strains. Some strains considered dangerous were identified, and, although with a prevalence lower than the remainder, appeared well adapted to the hospital environment demanding rational preventive measures.

* Publicada a pedido dos autores





Sistema miniaturizado de diferenciação de microorganismos.

O Seu laboratório em miniatura

Em um único sistema compacto, MINITEK® oferece-lhe a diferenciação de microorganismos que é personalizado para manter sua rotina.

MINITEK® oferece-lhe comprovadamente precisão e reproduzibilidade nos resultados para identificação de

Enterobacteriaceae

Anaerobios

Neisseria

Não Fermentadores de Dextrose

Leveduras

Além de precisão e reproduzibilidade nos resultados, MINITEK® proporciona-lhe dentre outros os seguintes BENEFÍCIOS:

FÁCIL manuseio

RAPIDEZ de operação

VALIDADE de 2 a 3 anos

SISTEMA TAXONÔMICO NUMÉRICO

AMPLA variedade de substratos

Tudo isso garantido pela já mundialmente comprovada QUALIDADE BBL.

Para maiores informações ou demonstrações, por favor consulte-nos.

B-D BECTON DICKINSON
INDÚSTRIAS CIRÚRGICAS S.A.

Divisão de Laboratório
R. Said Alach 302 - Paraiso
São Paulo - SP CEP: 04003
Fones: 549-8133, 71-7170

BBL e Minitek são marcas registradas de Becton, Dickinson and Company.

MINITEK

DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS CIENTÍFICOS LTDA.



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

SIGMA Produtos bioquímicos	CARTER-WALLACE Kit de toxoplasma e criptococos	WELLCOME Antígenos e antisoros
TURNER /ESPECTRA Fotômetros de chama Espectrofotômetros Fluorômetros	HYCEL Contadores automáticos de células, Kits superanalizers	PFIZER Antigex-Hepatitis em 4 minutos
TRANS-DYNE Densitômetros	DIGIMETRIC Balanças eletrônicas.	GAS PAK Jarras e componentes
SHERWOOD Sistema Monoject, Aguilhas, Paraplast, Coagulyzer	CLAY ADAMS Contadores de células, Centrifugas	FLOW LABORATORIES Meios p/ cultura de tecidos, Antígeno Rubella, Equipamento p/ microtitulação
THE NUCLEUS Gamma Counters	InLAB (Produção própria) Bacti-Swabs, Uro-Dips, Lancetas, Capilares, Agulhas, Detergentes	SWIFT Microscópios estéreo, Binocular, Koehler, de imunofluorescência.
HARLECO-S/P Corantes e aparelhos	DRUCKER Centrifugas refrigeradas	LIVROS TÉCNICOS Novidades em microbiologia, imunologia, bioquímica, eletroforese
S & S Papel de filtro	OHAUS Balanças para laboratórios e indústrias	THERMOLYNE Agitadores, Mufas, Banhos a seco.
BARNSTEAD Água Deionizada Qualidade Reagente. Ultrapura	GENERAL DIAGNOSTIC Soros controle Tromboplastina cárlica	DOLES Kits bioquímicos
F.T.S. Liofilizadores Câmaras Ultrafria	CULTURETTES Transporte de amostras bacteriológicas	CLINILAB Centrifugas.
NATIONAL Urinômetros, refractômetros	B & L (Bausch & Lomb) Microscopia	LKB Gamma e Beta Counters
PRODUTOS QUÍMICOS MCB, Pfaltz & Bauer, Aldrich, USB, Hümko, Pierce, Calbiochem, ICN, Baker, Eastman, INLAB, Fluka.	OXFORD Imunodifusão, Pipetadores, Diluidores, Kits, Cálculo Urinário, Bicarbonato, Micropipetas.	GILFORD Espectrofotometria de Precisão.
NUCLEPORE Membranas filtrantes	ASSISTÊNCIA TÉCNICA Conserto e manutenção de aparelhos para laboratórios. Peças originais.	PHARMACIA FINE CHEMICAL Produtos para Cromatografia e Separações Bioquímicas
PROPPER Lâminas, lâminulas, Pipetas glób. brancos e vermelhos		GELMAN Eletroforese, Membranas filtrantes
		LB (Produção nacional) Meios de cultura em placa, tubos e frascos, corantes, reagentes, soluções, padrões.