

Impl. 19.10.93



1150001254

T/UNICAMP
Sa39d
BCCL

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

DIFERENÇAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE
LINHAGENS PIGMENTADAS E NÃO PIGMENTADAS
DE Staphylococcus aureus

Sonia Presa de Salzberg

Orientador:

Dr. Fumio Yokoya

Professor da Faculdade de Engenharia de Alimentos

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos.

Sa39d

1254/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ÍNDICE

	página
RESUMO.....	I
SUMMARY.....	III
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
<u>Staphylococcus aureus</u> : evolução taxonômica.....	4
Caracterização do <u>Staphylococcus aureus</u>	4
Pigmento em <u>Staphylococcus aureus</u>	6
MATERIAIS E MÉTODOS	
Isolamento e caracterização do <u>Staphylococcus aureus</u>	9
Estudo de meios em relação à produção de pigmento.....	11
Estudo do efeito da concentração salina e do tempo de conservação das culturas, a 10 °C, na produção de pigmento.....	12
Estudo da cinética de crescimento de duas variantes da linhagem N° 50, com diferentes graus de pigmentação.....	13
Obtenção de variantes a partir das linhagens originais pigmentadas.....	15
Caracterização das linhagens e suas variantes não pigmentadas.....	17
RESULTADOS	
Caracterização das linhagens de <u>Staphylococcus aureus</u>	22
Estudo de meios em relação à produção de pigmento.....	22

ÍNDICE (Continuação)

página

Estudo da influência da concentração salina (NaCl) e do tempo de conservação a 10 °C na produção de pigmento.....	23
Cinética de crescimento.....	23
Obtenção de variantes a partir das linhagens originais pigmentadas.....	29
Caracterização das linhagens originais e suas variantes.....	33
Tipificação pelos bacteriófagos.....	37

DISCUSSÃO

Estudo dos meios utilizados na produção de pigmento.....	48
Estudo da influência da concentração salina e do tempo de conservação a 10 °C na produção de pigmento.....	48
Cinética de crescimento.....	49
Obtenção de variantes e sua caracterização....	51
Tipificação pelos bacteriófagos.....	53

CONCLUSÕES.....	55
-----------------	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
---------------------------------	----

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro		página
1	Valores da densidade ótica nas temperaturas de 21 e 47 °C das variantes de <u>S. aureus</u> 50a, 50b e S-6 incubadas durante 24 horas nos meios BHI e BHI + 12% NaCl.....	27
2	Valores das constantes específicas de crescimento nas temperaturas cardinais máxima e ótima para as variantes de <u>S. aureus</u> 50a e 50b nos meios BHI e BHI + 12% NaCl.....	28
3	Caracterização da linhagem Nº 50 e suas variantes espontâneas.....	38
4	Caracterização das variantes da linhagem Nº 50 obtidas pela ação da NTG.....	40
5	Caracterização das variantes da linhagem Nº 50 obtidas pela ação da luz ultravioleta.....	43
6	Caracterização da linhagem Nº 85 e suas variantes espontâneas.....	44
7	Caracterização das linhagens de <u>S. aureus</u> 87, 89 e 113 e suas variantes espontâneas, e da linhagem S-6.....	45
8	Relação de porcentagens de incidência de variantes espontâneas derivadas das linhagens de <u>S.</u>	

INDICE DE QUADROS (Continuação)

Quadro

página

	<u>aureus</u> 50, 85, 87, 89 e 113 e da perda ou con- servação das enzimas coagulase, DNase e hemo- lisina.....	46
9	Relação de porcentagens de incidência de va- riantes não pigmentadas derivadas da linhagem Nº 50, espontâneas e induzidas, e da perda ou conservação das enzimas coagulase, DNase e he- molisina.....	47.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	página
1	Exemplos de curvas de crescimento na fase <u>ex</u> ponencial das variantes de <u>S. aureus</u> 50a e 50b nos meios BHI e BHI + 12%NaCl.....24
2	Curva utilizada na transformação dos valores de densidade óticas em massa celular sêca, para cultura de <u>S. aureus</u> Nº 50 em meio BHI....25
3	Gráfico de Arrhenius para <u>S. aureus</u> 50a e 50b nos meios BHI e BHI + 12% NaCl.....30
4	Curva de sobrevivência da linhagem <u>S. aureus</u> 50a, à ação da NTG.....32
5	Curva de sobrevivência da linhagem <u>S. aureus</u> 50a, à ação da luz ultravioleta.....34

RESUMO

Testes bioquímicos e fisiológicos foram realizados em linhagens de Staphylococcus aureus pigmentadas e suas variantes não pigmentadas com o intuito de estudar a relação entre estas propriedades e a produção de pigmento pelo microrganismo.

Consideração especial foi dada ao estudo da resistência dos microrganismos à concentração salina e temperatura, devido à importância destas propriedades na microbiologia de alimentos.

As diferentes linhagens apresentaram incidência variável para as variantes não pigmentadas espontâneas. O uso de agentes mutagênicos aumentaram a incidência de variantes apigmentadas entre 3 a 10 vezes em comparação com valores observados para as variantes espontâneas.

Variantes não pigmentadas, derivadas de linhagens pigmentadas, não reverteram para a forma pigmentada, quer espontaneamente, quer pela ação da nitroso-guanidina.

A perda de algumas características bioquímicas, tais como, produção de coagulase e DNase termo-resistente e utilização de certos carboidratos, foram ou não acompanhadas da perda da capacidade de produção de pigmento. A enzima penicilina se foi mantida nas variantes apigmentadas obtidas espontaneamente.

A tipificação pelos bacteriófagos das variantes apig-

mentadas derivadas de uma das linhagens utilizadas mostrou sensibilidade a dois bacteriófagos a mais em comparação ao fagótipo da linhagem original. As linhagens restantes e suas variantes possuíam a mesma sensibilidade aos agentes citados.

Resultados parciais de presença de enterotoxina são tam
bém apresentados.

SUMMARY

To study the correlation of several biochemical and physiological properties with the production of pigment by the Staphylococcus aureus, various tests were carried out on pigmented strains and their non-pigmented variants.

Special emphasis was given to the study of the resistance of the microorganism to salt concentration and temperature due to the importance of these properties in food microbiology.

The incidence of non-pigmented spontaneous variants was found to vary for different strains. This incidence was increased from 3 to 10 times by the use of mutagenic agents.

Non-pigmented variants from originally pigmented strains did not revert back to the pigmented state. This fact was observed on spontaneous as well as on induced variants.

It was found that the change in some biochemical properties such as coagulase and thermoresistant DNA'se production and carbohydrate utilization could or could not follow the loss of pigmentation. Penicillinase production was not lost with the loss of pigment.

The phagetyping of non-pigmented variants from one of the tested strains showed sensitivity to two additional phages as compared to the phagetype of the original strain. The other tested strains did not show a phage sensitivity change.

Partial results for enterotoxin production are also presented.

I - INTRODUÇÃO

A presença de pigmento em amostras de estafilococos tem sido considerada através do tempo como indicação de patogenicidade de potencial. Posteriormente foi verificado que a presença das enzimas coagulase e DNase termo-resistente constituíam um melhor critério na estimativa da patogenicidade do microrganismo, sendo o carácter coagulase positivo encontrado com maior frequência entre as linhagens pigmentadas.

Outra característica importante associada à presença do pigmento é o aumento da resistência do microrganismo à ação de certos agentes físicos e químicos. Com efeito, tem-se observado diferenças marcantes no comportamento das linhagens pigmentadas e não pigmentadas, referentes à ação da foto-oxidação, dessecação e do ácido linoléico.

Outro aspecto interessante das linhagens de estafilococo relacionado à pigmentação é o aparecimento de derivados não pigmentados ou com diferentes graus de pigmentação, após subcultura do microrganismo original pigmentado conservado em estoque. Esta característica é mais acentuada nas linhagens conservadas durante longo tempo.

Estudos concernentes à produção de pigmento e sua relação com outras propriedades, bioquímicas e fisiológicas, assim como a interpretação da sua natureza genética são pouco conclusivos, sendo frequentes as contradições entre os resultados de diferentes autores. Neste trabalho pretende-se estudar e comparar

características bioquímicas e fisiológicas de linhagens pigmentadas e suas variantes não pigmentadas, espontâneas e induzidas pelo uso de agentes mutagênicos; tendo o objetivo de contribuir para o conhecimento da natureza e implicações da presença de pigmento em Staphylococcus aureus.

Uma primeira diferença de comportamento foi encontrada no estudo da cinética de crescimento de duas variantes que apresentavam grau desigual de pigmentação. Neste caso observou-se que a variante pigmentada crescia melhor que a não pigmentada a temperaturas mais elevadas e em presença de cloreto de sódio. Em vista deste comportamento, pensou-se em analisar um maior número de propriedades utilizando-se diferentes linhagens pigmentadas e suas respectivas variantes não pigmentadas, espontâneas, assim como variantes espontâneas e induzidas a partir da linhagem Nº 50. Neste caso foram utilizados como agentes mutagênicos, luz ultravioleta e nitroso-guanidina.

Para estudar a presença de coagulase e DNase termo-resistente foram utilizados inóculos padronizados com o fim de obter resultados quantitativos e ter, uma base de comparação entre as linhagens e suas variantes, não somente em relação à presença ou ausência de enzimas, mas também a um aumento ou diminuição da produção destas.

Foram feitos também em todas as linhagens e suas variantes testes de presença de hemolisinas, usando-se sangue de carneiro, assim como testes de utilização de carboidratos.

A detecção da presença da enzima penicilinase teve como fim estabelecer as relações entre a perda de pigmento e a presen

ça da enzima, com o intuito de procurar uma possível explicação sobre a natureza genética do pigmento. Analogamente, a pesquisa da presença de enterotoxina foi feita para conhecer as possíveis relações entre pigmentação e produção de toxina e as consequência da perda de pigmento nesse carácter.

Por último, como controle da filiação das variantes obtidas e para eliminar dos estudos comparativos uma possível contaminação, procedeu-se à tipificação pelos bacteriófagos de todos os microrganismos em estudo. Esta análise mostraria ainda possíveis diferenças entre o fagótipo da linhagem original e os fagótipos das variantes apigmentadas.

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 - Staphylococcus aureus: evolução taxonômica

Em 1880 Alexander Ogston na Escócia e Louis Pasteur na França acharam que um tipo de coco disposto em arranjos irregulares era a causa de abscessos no homem. Ogston denominou o microrganismo de Staphylococcus em 1882, e em 1884 Rosenbach foi o primeiro a isolá-lo em cultura pura e estudar as suas características. Este pesquisador observou que algumas amostras em meios sólidos davam origem a colônias de cor laranja e outras a colônias brancas, e propoz para estes microrganismos os nomes de S. pyogenes aureus e S. pyogenes albus, respectivamente. Os estafilococos foram reclassificados repetidas vezes dentro e fora do gênero Micrococcus. Evans, Bradford e Niven em 1955 (10) propuseram que o gênero Staphylococcus deveria ser separado do gênero Micrococcus baseados na sua habilidade de utilizar a glicose anaerobicamente e assim apareceu na sétima edição do Manual de Bergey (4). Na oitava edição do mesmo manual ambos os gêneros aparecem na família Micrococcaceae (5).

2 - Caracterização do Staphylococcus aureus

O S. aureus é um microrganismo catalase positivo e Gram positivo com arranjo em forma de cacho de uva, quando proveniente de meio sólido, ou de cadeias curtas quando proveniente de meio líquido. Forma colônias circulares e convexas, de superfície lisa ou ligeiramente granulosa com bordos regulares ou levemente

irregulares, de coloração branca até diferentes tonalidades de amarelo e laranja, mostrando as vezes cor de limão. O microrganismo é anaeróbico facultativo, mesófilo, crescendo melhor em condições aeróbicas e na faixa de 35 a 43 °C, sendo o pH ótimo para crescimento ao redor de 7,0 - 7,5. Requer 12 aminoácidos, juntamente com adenina e tiamina para crescimento aeróbico (Mah, Fung e Morse, (18)), além de uracil e fonte de carbono fermentavel para crescimento anaeróbico (Richardson, (24)). Cresce bem nos meios complexos tais como o meio "Brain Heart Infussion" (Infusão de cérebro e coração) da Difco ou BBL e hidrolisados de caseína como o NAK da Sheffield Chem. Co. A maioria das linhagens é capaz de desenvolver-se na presença de 15 % de cloreto de sódio ou 40 % de bilis. A atividade de água mínima necessária para crescimento aeróbico é de 0,85 - 0,86 (Scott, (26)).

De modo geral as amostras de estafilococos patogênicos mostram grande tolerância a sais como: cloreto de lítio, telurito de potássio, cianeto de potássio e azida sódica. Apresentam, via de regra tolerância a aminoácidos como a glicina e a antibióticos como a polimixina. Algumas destas substâncias são utilizadas na formulação de meios seletivos (Baird - Parker (3); Crisley, Angelotti e Foter (7); Holbrook, Anderson e Baird - Parker (13)). Tais meios porém, não são inibidores para todos os contaminantes; após o isolamento é necessário realizar a identificação do microrganismo através dos testes usuais de diagnóstico: utilização de glicose em anaerobiose, coagulação de plasma humano ou de coelho, hemólise de hemácias de certas espécies de animais e produção de hemolisina termo-resistente.

A diferenciação entre as linhagens pode ser realizada pela tipificação com bacteriófago (Parker (22); Wentworth (31)). Linhagens de natureza humana e animal são também diferenciadas na base de : susceptibilidade a certo grupo de fagos, tipo de hemólise produzida, composição antigênica da parede celular e características bioquímicas em geral.

A superfície e as mucosas do corpo humano e de outros mamíferos são o melhor habitat natural do microrganismo. Cerca de 50 % dos indivíduos possuem ou já possuíram o microrganismo na mucosa nasal, em algum momento de sua vida. Na pele essa proporção é geralmente menor.

Os alimentos são contaminados, principalmente, pelo manuseio de portadores humanos ou a partir de alimentos básicos de origem animal como leite e carne. Alimentos cárneos semi-preservados pelo uso de sal, secagem, etc., são muito apropriados para o desenvolvimento destes microrganismos. A baixa atividade de água e a presença de cloreto de sódio, condicionam um meio altamente seletivo para seu desenvolvimento.

3 - Pigmento em Staphylococcus aureus

Os pigmentos de S. aureus são do tipo carotenoide, principalmente γ -caroteno e rubixantina (Suzue e Tanaka (30)). Muitas características do microrganismo estão relacionadas com a presença ou ausência de pigmento, tais como: resistência a antibióticos (Suzue e Tanaka (30)), ao efeito foto-oxidativo da radiação luminosa (Kinisawa e Stanier (14)), a dessecação e ao ácido linolêico (Grins

ted e Lacey (11)).

Durante a década de 1950, vários pesquisadores concordaram que as diferenças na pigmentação não eram suficientemente importantes como critério de patogenicidade, porque muitos microrganismos não pigmentados provaram ser patogênicos (Elek e Levy (9); Shaw, Stitt e Cowan (28)). A partir desse momento outras características como presença de : coagulase, DNase termo-resistente e lisozima, foram consideradas de importância maior na determinação da patogenicidade sendo reservados os nomes S. aureus para linhagens patogênicas e S. epidermidis, antigo S. albus, para as não patogênicas, independentemente da cor da colônia. Apesar disto observa-se alta correlação entre a presença de pigmento e a presença da enzima coagulase, sendo pigmentadas a maioria das amostras coagulase positivas isoladas de hospitais (Grinsted e Lacey (11); Abo - Elnaga e Kandler (1)).

Devido à falta de uniformidade dos diferentes meios com respeito à intensidade e qualidade da pigmentação, vários pesquisadores procuraram desenvolver meios que facilitassem a produção de pigmento (O'Connor, Willis e Smith (21); Stewart (29); Willis, O'Connor e Smith (32); Willis, Smith e O'Connor (33); Willis e Turner (34)). O princípio básico na sua formulação é a adição de monoglicerídeos ou de lipídeos naturais de leite de vaca ou seus correspondentes sabões, a um meio basal com agar.

Variantes não pigmentadas de S. aureus são facilmente achadas em subculturas de organismos em estoque (Pinner e Voldrich (23); Doudoroff (8); Servin - Massieu (27)) e tratamento com ni-

troso - guanidina e outros agentes mutagênicos (Altenbern (2)) podem resultar na perda irreversível da capacidade de sintetização de pigmento. A alta frequência da perda deste parece sugerir natureza extracromossômica para os gens que codificam essa propriedade (Grinsted e Lacey (11)). Entretanto, a presença de um plasmídeo típico responsável pela produção de pigmento é considerada como pouco provável, por não ter sido possível, até o momento, produzir colônias pigmentadas a partir de não pigmentadas, pelos métodos de transdução ou transformação.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Isolamento e caracterização de Staphylococcus aureus

1.1 - Isolamento

Para o isolamento de estafilococos da mucosa nasal foram feitos esfregaços da narina diretamente no meio de agar com telurito e gema de ovo sem polimixina (Baird - Parker modificado -BPM).

Para o isolamento de estafilococos a partir de produtos alimentícios, estes foram moidos e ressuspensos em solução salina (NaCl 0,85 %). Uma alíquota desta suspensão foi adicionada em meio de enriquecimento seletivo (infusão de cérebro e coração + 10 % NaCl) e incubado a 37 °C durante 24 horas, aproximadamente.

Após a incubação fez-se o isolamento por esgotamento nos meios: BPM, Staphylococcus 110, e Chapman Stone da firma Difco. A maior parte das colônias foi selecionada de acordo com as características peculiares de patogenicidade em cada meio:

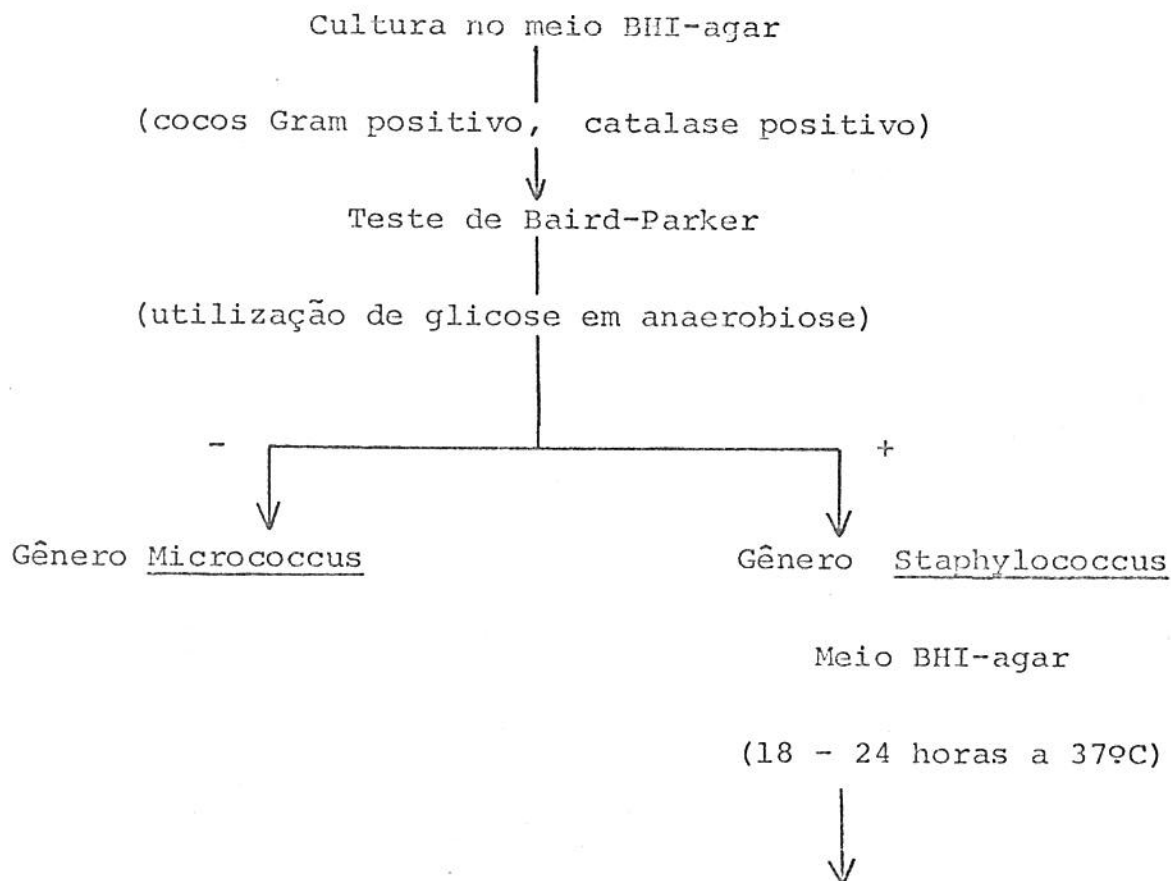
- a) Meio BPM: colônias com aspecto preto brilhante (precipitação do telurito de potássio) com halo opaco (presença da enzima lecitina se).
- b) Meio Staphylococcus 110: colônias cor amarelo laranja (pigmento carotenóide de estafilococo).
- c) Meio Chapman Stone: colônias com halo de transparência (presença da enzima gelatinase).

Com as colônias selecionadas de acordo com as caracterís-

ticas supra mencionadas foram realizadas colorações pelo método de Gram e testes para a verificação da produção de catalase. As colônias que coloração de Gram apresentaram microrganismos sob a forma de cocos, dispostos em aglomerados, e que produziram catalase, foram repicados para o meio de BHI agar, para posterior caracterização.

1.2 - Caracterização das amostras isoladas

Foram seguidas, em linhas gerais, as recomendações de Baird - Parker, procedendo-se de acordo com o seguinte esquema:

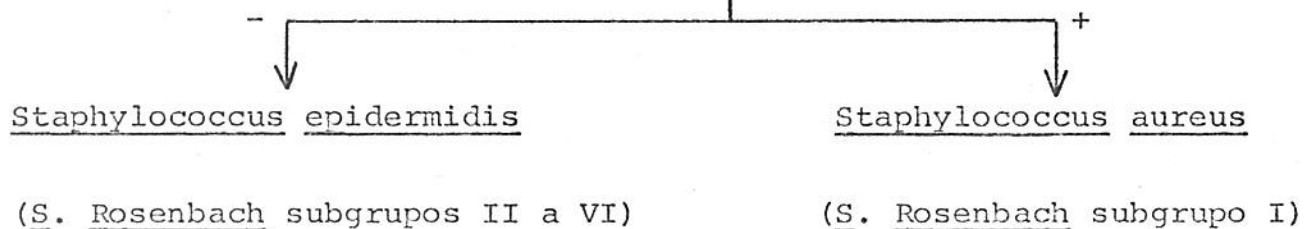


↓
Testes de patogenicidade:

1- coagulase

2 - DNase termo-resistente

3 - hemolisina



Uma vez classificadas como S. aureus as linhagens foram numeradas e repicadas em meio BHI-agar, para utilização imediata, e em meio "Litmus Milk", com posterior congelamento a -20 °C, para conservação por tempo indefinido.

2 - Estudo de meios em relação à produção de pigmento

2.1 - Meios utilizados

- a) BHI - agar
- b) BHI - agar + 7 % de NaCl
- c) BHI - agar + 10 % de leite
- d) BHI - agar + 10 % de leite + 7 % de NaCl
- e) BHI - agar + 10 % de creme de leite
- f) BHI - agar + sabão

2.2 - Preparo dos meios

- a) BHI - agar, adquirido da Difco.
- b) BHI - agar + 7 % NaCl; preparado pela adição de cloreto de sódio ao meio BHI - agar.
- c) BHI - agar + 10 % de leite; preparado pela adição de 10 % de leite em pó reconstituído e previamente esterilizado em autoclave ao meio BHI - agar base.
- d) BHI - agar + 10 % de leite + 7 % de NaCl; preparado em forma similar aos anteriores.
- e) BHI - agar + 10 % de creme de leite. O meio a) foi adicionado de 10 % de creme de leite previamente esterilizado. Devido à falta de homogeneidade do teor de gordura e pH no creme de leite, especialmente a influencia deste último fator no processo de esterilização, não foi possível preparar o meio nestas condições. Para obter um produto mais homogêneo e com características similares ao agar - creme, o creme de leite foi saponificado com potassa alcoólica. Este sabão foi esterilizado e adicionado em quantidade equivalente a 10 % de creme de leite ao meio a), obtendo-se o meio denominado f).
- f) Descrito no meio anterior.

3 - Estudo do efeito da concentração salina e do tempo de conservação das culturas, a 10 °C, na produção de pigmento

O estafilococo N° 50 incubado em meio BHI, a 37 °C por 24

horas, foi diluído em solução salina e semeado na superfície de placas com o meio BHI - agar + 10 % de leite com as seguintes concentrações de NaCl: 0%, 3%, 6%, 9%, 12% e 15%. As placas foram observadas semanalmente e fotografadas após a verificação de variações da cor das colônias.

4 - Estudo da cinética de crescimento de duas variantes da linhagem Nº 50, com diferentes graus de pigmentação.

4.1 - Meios

Os meios de crescimento utilizados foram BHI e BHI + 12% de NaCl.

4.2 - Preparação do inóculo

Uma alça de cultura foi semeada em tubo contendo o meio BHI e incubada a 37 °C, sem agitação, durante 18 a 24 horas. No dia seguinte transferiu-se 5 ml da cultura para um frasco Erlenmeyer contendo 45 ml de meio BHI e incubou-se a 37 °C com agitação (200 rpm; agitador rotatório da New Brunswick Sci. Co.) durante duas horas. A semeadura foi feita transferindo-se 0,05 ml de inóculo (1 gota de micropipeta sorológica calibrada) em cada tubo contendo 10 ml de meio BHI. Estes tubos em forma de "L" são especiais para operar no incubador de temperatura gradiente (Scientific Industries Inc., New York).

4.3 - Incubação e medida do crescimento da cultura

O intervalo de temperatura foi ajustado entre 19 e 50 °C, utilizando-se um total de 30 tubos. A variação de temperatura entre dois tubos contíguos foi de 0,4 a 1,5 °C dependendo da posição dos tubos no incubador gradiente (diferença menor foi observada na zona central e maior nos tubos das extremidades). A incubação foi feita sob agitação angular recíproca de 30 ° com velocidade de 30 ciclos por minuto. O crescimento do microrganismo determinado pelo método turbidimétrico (D. O.) utilizando-se colorímetro Bausch and Lomb Spectronic 20, especialmente adaptado para operar com tubos de 20 mm de diâmetro. A leitura foi efetuada no comprimento de onda de 600 nm em intervalos regulares de tempo, geralmente de 15 minutos.

As curvas de crescimento foram obtidas plotando o logaritmo das densidades óticas contra tempo. As constantes específicas de crescimento (k) foram determinadas dos segmentos retilíneos de máximo declive nas curvas de crescimento e calculadas pela fórmula:

$$k = \frac{2,303 (\log x_2 - \log x_1)}{t_2 - t_1} \text{ min}^{-1}$$

onde x_1 e x_2 são as densidades óticas nos tempos t_1 e t_2 respectivamente. A partir das constantes de crescimento k, obtidas a diferentes temperaturas, foram traçados os gráficos de Arrhenius para as duas variantes.

5 - Obtenção de variantes a partir das linhagens originais pigmentadas

5.1 - Obtenção de variantes espontâneas com pigmentação diferente da original

O método utilizado foi diluição e semeadura em placas com meio BHI - agar + 10 % de leite + 7% de NaCl, das linhagens correspondentes aos números: 50, 85, 87, 89 e 113. Foram selecionadas variantes apigmentadas ou apresentando pigmentação diferente da original pertencendo a maior parte delas a esta primeira categoria.

5.2 - Obtenção de variantes induzidas a partir da linhagem N° 50

5.2.1 - Variantes induzidas pela ação da N metil-N nitro -N nitroso guanidina (NTG)

Trabalho-se com cultura densa de 24 horas em meio BHI-agar inclinado, diluída em 50 ml de BHI. Foi utilizada uma alíquota desse volume para diluição e semeadura em placas com meio BHI - agar + 10% leite + 7% NaCl, a fim de determinar o número inicial de microrganismos. O resto da cultura foi distribuído em alíquotas de 1 ml em tubos de centrifuga, correspondendo cada tubo a um tempo pre-determinado de exposição ao agente mutagênico. Cada tubo foi adicionado de 3 ml de solução de 4 mg/ml de NTG em tampão de citrato 0,05 M, pH 5,0.

A exposição da cultura ao agente mutagênico foi de: 10 - 20 - 40 - 60 - 80 - 100 - 120 - 140 - 160 e 180 minutos. Immedia-

tamente após cada tempo de exposição as culturas foram centrifugadas, lavadas duas vezes com solução salina e ressuspensas em seu volume inicial. Este volume foi dividido em duas porções: 0,1 ml para diluições e semeadura em placas, e o volume restante para inoculação em 50 ml de BHI e incubação a 37 °C com agitação (250 rpm). Das culturas com fermentação submersa, após 24 horas de incubação foram feitas novas semeaduras, em placas contendo o meio BHI - agar. Os resultados dessas semeaduras foram utilizados para a construção da curva de sobrevivência e para a determinação da incidência de variantes não pigmentadas. Esta técnica foi utilizada para a linhagem Nº 50 e para a variante não pigmentada Nº 50 - 2.

5.2.2. - Indução de variantes pela ação da luz ultravioleta (UV)

Neste caso utilizou-se cultura de 24 horas no meio BHI - agar. A massa celular foi ressuspensa em 5 ml de água estéril e a suspensão resultante diluída até um valor de densidade ótica de 0,30, lido no colorímetro. Utilizou-se uma alíquota de 1 ml de suspensão bacteriana para diluições e semeadura em placas com meio BHI - agar + 10 % de leite + 7 % de NaCl, para determinação do número inicial de microrganismos. O volume restante, 10 ml aproximadamente, foi colocado em placa de Petri aberta, previamente esterilizada, e exposta a luz UV (lâmpada UV de 15 watts com banda forte aos 245 nm e banda fraca aos 365 nm) a 35 cm de distância e sob agitação.

Foram retiradas alíquotas de 0,1 ml da suspensão bacteriana para diluição e semeadura em placas com meio BHI - agar + 10 % de leite + 7 % de NaCl, após os seguintes intervalos de tempo de tratamento: 1 - 2 - 4 - 6 - 8 - 10 - 12 e 18 minutos. O número inicial de microorganismos e o número após diferentes tempos de tratamento foi utilizado para a construção da curva de sobrevivência.

5.2.3 - Obtenção de variantes pelo método de congelamento e descongelamento

A linhagem estafilococo Nº 50 inoculada em BHI durante 18 horas foi submetida a congelamento (- 20 °C). Amostras foram retiradas após diferentes intervalos de tempo (2, 4, 7 e 15 dias), diluídas e semeadas em placas.

6 - Caracterização das linhagens e suas variantes não pigmentadas.

Os testes utilizados foram os seguintes:

- a) Produção de coagulase, DNase termo-resistente, hemolisinas, acetoinas (Voges - Proskauer), penicilinase e enterotoxina.
- b) Utilização dos carboidratos manitol, lactose e maltose.
- c) Tipificação feita com o Conjunto Básico Internacional de bacteriófagos (grupos I, II e III); 4 bacteriófagos não classificados (81, 94, 95 e 96); 6 bacteriófagos experimentais: (86, 89, 90, 92, D-11 e HK₂) e dois bacteriófagos extras (42D e 187).

6.1 -- Testes realizados de acordo com as recomendações de Baird -Parker (3) para a caracterização de S. aureus

Todos os testes foram realizados com cultura de 18 horas em meio BHI líquido.

6.1.1 - Produção de coagulase

A produção de coagulase foi determinada com inóculo inicial controlado (0,05 ml medido com micropipeta sorológica de uma cultura de densidade ótica de 0,20. Foi utilizado plasma de coelho Difco liofilizado, reconstituído com 3 ml de água destilada e distribuído em porções de 0,3 ml em tubos de 0,5 mm de diâmetro. Após incubação em estufa a 37 °C foram realizadas observações com 4 horas e 24 horas, considerando-se positivos os tubos que apresentaram qualquer grau de coagulação.

6.1.2 - Produção de acetoina (modificação de Barritt do teste de Voges Proskauer (3))

Para a verificação da produção de acetoina por amostras de estafilococos utilizou-se técnica e meio de cultura recomendados por Baird-Parker. Saliente-se que ao contrario do que ocorre com as enterobactérias, a leitura da reação é feita depois de 14 dias de incubação a 30 °C.

6.1.3 - Teste de utilização de carboidratos (3)

O meio básico utilizado foi o recomendado por Baird-Parker

adicionando-se 5 % de uma solução de carboidrato a 10%, previamente esterilizada por filtração. O meio foi distribuído em placas e após solidificação as amostras em estudo foram semeadas em estria e as placas incubadas a 30 °C. Foram realizadas observações diárias durante uma semana. As amostras consideradas positivas foram as que mostraram o aparecimento de uma faixa amarela ao longo das estrias devido à viragem do indicador adicionado (bromocresol púrpura).

6.2 - Teste da produção da enzima DNase termo-resistente (16)

O princípio envolvido nesta reação é a mudança da coloração azul apresentada pelo complexo agar-DNA-azul de metileno para coloração rosa em consequência do rompimento deste complexo pela enzima DNase.

A reação foi realizada em lâmina previamente coberta pela mistura agar-DNA-azul de metileno preparada com tampão Tris 0,05 M, pH 9,0. As lâminas foram preparadas com antecipação e guardadas em câmara úmida.

No dia do teste foram feitos orifícios de aproximadamente 3 mm, dispostos em dupla fileira e distanciados 1 cm dos orifícios adjacentes. Culturas com 18 a 24 horas de incubação foram padronizadas para uma D.O. de 0,20 e divididas em duas partes, sendo uma aquecida a 100 °C durante 20 minutos. Estas foram inoculadas nas lâminas preparadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur utilizando-se os orifícios superiores para as culturas aquecidas e os inferiores

res para as que não sofreram esse tratamento. A primeira observação foi realizada após 3 horas de incubação a 37 °C; e a última após 24 horas. Em cada observação determinou-se o diâmetro da zona de metacromasia, sendo este valor uma medida quantitativa da enzima DNase presente.

6.3 - Teste de produção de hemolisinas

O meio utilizado foi o agar-sangue preparado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Fez-se a inoculação em placas em forma de estria, a partir de uma cultura de 18 a 24 horas. A presença de hemolisinas foi verificada após 24 horas de incubação a 37 °C. A hemolisina α e/ou γ apresentaram caracteristicamente um halo transparente. Para a detecção da presença de hemolisina β as placas foram colocadas a 4 °C durante 24 horas.

6.4 - Determinação de penicilinase extracelular pelo método da cromatografia em camada delgada (20)

A cromatografia foi realizada em camada de sílica-gel, G-60 Merck na proporção de 33 g para 100 g de água. Como solvente foi utilizada a mistura: butanol-acetato de etila-cloroformio e ácido acético. As amostras a serem estudadas foram semeadas em meio BHI e incubadas a 37 °C com e sem agitação durante 18 horas. Após este tempo 5 ml de cultura foram adicionados a igual volume de uma solução a 2 % de penicilina G, em solução tampão borato pH 8,0, mantendo-se a mistura a 40 °C durante 12 horas. Após o tempo de incubação a mistura foi colocada nas placas por meio de micro aplicador. Foram utilizadas como

padrões: solução de penicilina a 2 %, solução de ácido 6 amino penicilânico a 0,1 %, e a linhagem Bacillus cereus var. mycoides ATCC 9634 (penicilinase positivo).

Deixou-se migrar o solvente 10 cm e após a secagem da placa a revelação foi feita com solução de ninhidrina e aquecimento a 100°C até aparecimento de manchas roxas indicativas da presença de penicilina e ácido penicilinoico. As linhagens penicilinase positiva não apresentaram a mancha correspondente a penicilina ou a apresentaram muito fraca juntamente com o aparecimento de outra mancha de Rf intermediário devido à formação de ácido penicilinoico como produto da ação enzimática da penicilinase.

6.5 - Detecção de enterotoxina.

A detecção da presença de enterotoxina nas amostras foi realizada pela equipe do Dr. M.S. Bergdoll nos laboratórios do Food Research Institute, Universidade de Wisconsin, U.S.A. com o método da dupla difusão em gel.

6.6 - Tipificação das linhagens por bacteriófagos

A tipificação das linhagens originais e suas variantes coagulase positivas foi realizada pela equipe de trabalho do laboratório do Dr. Carlos Solé Vermin da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (U.S.P.).

IV - RESULTADOS

1 - Caracterização das linhagens de Staphylococcus aureus

Todas as amostras de S. aureus utilizadas no presente trabalho deram reações típicas da espécie nos testes feitos para sua caracterização ou seja, produção de catalase, fermentação da glicose em anaerobiose, e produção de coagulase e DNase termo-resistente.

2 - Estudo de meios em relação à produção de pigmento

O meio BHI - agar com creme de leite favorece a produção de pigmento mais intenso tanto nas colônias incubadas a 37 °C em 24 a 48 horas, como a 10 °C por várias semanas. Outra característica do meio foi favorecer a visualização do pigmento devido ao contraste entre a cor amarelo-laranja das colônias e o fundo branco opalino do meio. Devido aos problemas surgidos na sua preparação, descritos no Capítulo III, foi substituído pelo agar - sabão. Neste último houve inibição do crescimento dos microrganismos para concentrações de sabão equivalentes a 10 % de creme. Com concentrações inferiores, houve desenvolvimento de colônias, mas o nível de pigmentação foi similar ao produzido no meio BHI-agar simples. Por esses motivos foram desprezados o uso, tanto da creme como do sabão, para testes de produção de pigmento.

O segundo melhor meio formador de pigmento, BHI-agar + 10 % de leite + 7 % de NaCl foi utilizado durante o desenvolvimento deste trabalho, devido à uniformidade dos seus constituintes de partida o que permitiu a obtenção de um meio com características

perfeitamente reprodutíveis.

3 - Estudo da influência da concentração salina (NaCl) e do tempo de conservação a 10 °C na produção de pigmento

As colônias mais pigmentadas se desenvolveram no meio BHI - agar + 3% de NaCl. Esta maior pigmentação observou-se após incubação a 37 °C durante 48 horas e durante o período de conservação de 2 meses a 10 °C. As placas com concentrações de sal de 6, 9 e 12 % respectivamente apresentaram colônias com pigmentação de crescente, sendo as menos pigmentadas as correspondentes a concentração de 12% de NaCl. Para concentrações de 0% e 15% de sal as colônias apareceram como não pigmentadas. A observação periódica de placas conservadas a 10 °C mostrou um deslocamento do nível de pigmentação para concentrações de sal superiores a 3%, isto é, 6 e 9%, para tempos de conservação superiores a dois meses.

A concentração salina, também, influenciou o tamanho das colônias, especialmente a concentrações superiores a 12%. Assim, para a concentração de 15% o diâmetro das colônias era de 5 a 10 vezes menor que para 12 % de NaCl.

4 - Cinética de crescimento

A figura 1 mostra os resultados da determinação da cinética de crescimento nos meios BHI e BHI + 12% de NaCl de duas variedades de S. aureus denominadas S. 50a e S. 50b, amarela e branca respectivamente, obtidas a partir da linhagem Nº 50 pelo método de

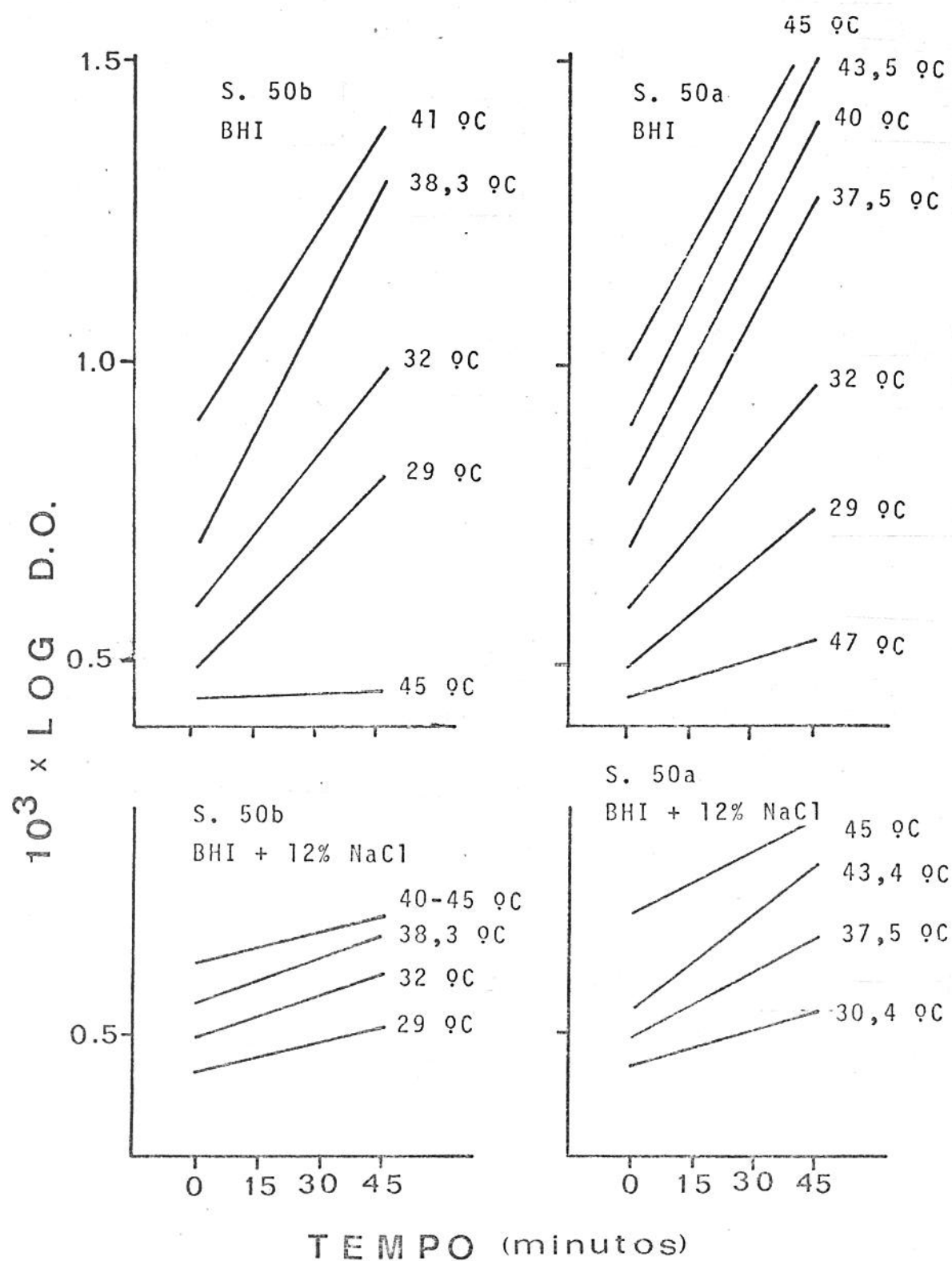


Figura 1: Exemplos de curvas de crescimento na fase exponencial das variantes de *S. aureus* 50a e 50b nos meios BHI e BHI + 12% NaCl.

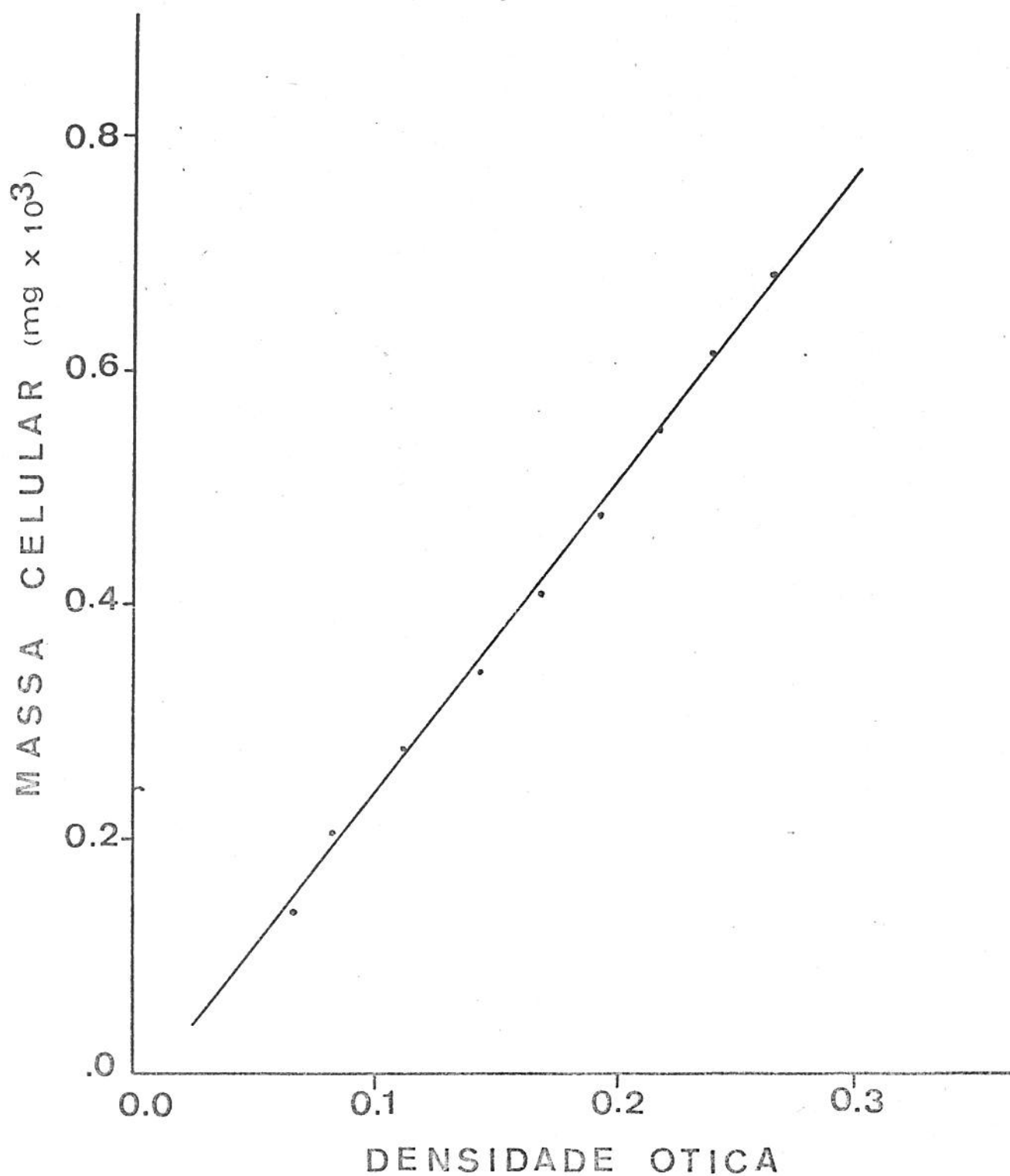


Figura 2: Curva utilizada na transformação dos valores de densidade óticas em massa celular seca, para cultura de S. aureus Nº 50 em meio BHI.

diluição e semeadura em placas. A partir destas curvas foram determinados os valores das constantes específicas de crescimento (k) que são apresentadas no quadro 2, e utilizadas na construção dos gráficos de Arrhenius (figura 3).

A linhagem apigmentada S-6 do Food Research Institute foi estudada com fins comparativos quanto às temperaturas cardinais de crescimento.

Os valores da densidade ótica nas temperaturas extremas do incubador gradiente (quadro 1) após 24 horas de incubação da uma ideia do comportamento das culturas nos dois meios utilizados. No extremo inferior $20 \pm 0,9$ °C as três culturas S. 50a, S. 50b e S-6 apresentaram o mesmo valor da D.O., aproximadamente 0,60 no meio BHI e 0,06 no meio BHI + 12 % NaCl. No extremo superior, $47 \pm 1,9$ °C, as culturas não pigmentadas apresentaram menor crescimento com D.O. 0,04 e 0,15 respectivamente para S. 50b e S-6. A variante pigmentada S. 50a apresentou D.O. maior que 1,2 tanto no meio BHI como no meio BHI sal.

Os valores das constantes específicas de crescimento, k, só foram determinados para as variantes pigmentadas S. 50a e não pigmentada S. 50b. Os valores máximos de k no meio BHI foram 0,0173 a 38,3 °C para a variante não pigmentada, e 0,014 a 43,4 °C para a variante pigmentada. No meio BHI sal obtiveram-se os valores 0,004 a 38,3 °C para a variante não pigmentada e 0,0052 a 41,7 °C para a variante pigmentada.

Os gráficos de Arrhenius para S. 50a e S. 50b (figura 3) ilustram o comportamento das culturas, observando-se:

Quadro 1: Valores da densidade ótica (D.O.) nas temperaturas de 21 e 47 °C das variantes de S. aureus 50a, 50b e S-6 (FRI) incubadas durante 24 horas nos meios BHI e BHI + 12% NaCl.

Temp. °C	Variante	D.O. Meio BHI	D.O. Meio BHI + 12% NaCl
21	S. 50a	0,60	0,06 0,13 (48 horas)
21	S. 50b	0,63	0,05 0,32 (48 horas)
21	S - 6 (FRI)	0,64	0,06 0,14 (48 horas)
47	S. 50a	1,7	1,2
47	S. 50b	0,04	0,04
47	s - 6 (FRI)	0,17 0,30 (48 horas)	0,15

Quadro 2: Valores das constantes específicas de crescimento (k) nas temperaturas cardinais máxima e ótima para as variantes de S. aureus 50a e 50b nos meios BHI e BHI + 12% NaCl.

Variante	Meio	Temperatura ° C	k
S. 50a	BHI	43,4 ± 1,9 ótima	0,0140
S. 50a	BHI	47,5 ± 1,9 máxima	0,0025
S. 50b	BHI	38,3 ± 0,9 ótima	0,0173
S. 50b	BHI	45,1 ± 1,0 máxima	0,0023
S. 50a	BHI + 12% NaCl	43,4 ± 1,9 ótima	0,0052
S. 50a	BHI + 12% NaCl	48,5 ± 1,9 máxima	0,0010
S. 50b	BHI + 12% NaCl	38,3 ± 0,9 ótima	0,0040
S. 50b	BHI + 12% NaCl	46,8 ± 1,9 máxima	0,0020

a) No meio BHI

- 1 - Valores de k maiores que no meio BHI sal para todas as temperaturas do intervalo 19 - 47 °C.
- 2 - Crescimento mais intenso para a variedade não pigmentada até o valor de temperatura ótimo, 38,3 °C. A partir desta temperatura observou-se crescimento mais rápido da linhagem pigmentada com um valor de k máximo a temperatura de 43,5 °C (quadro 2).
- 3 - Declínio rápido nos valores de k para ambas as culturas a temperaturas superiores às ótimas.

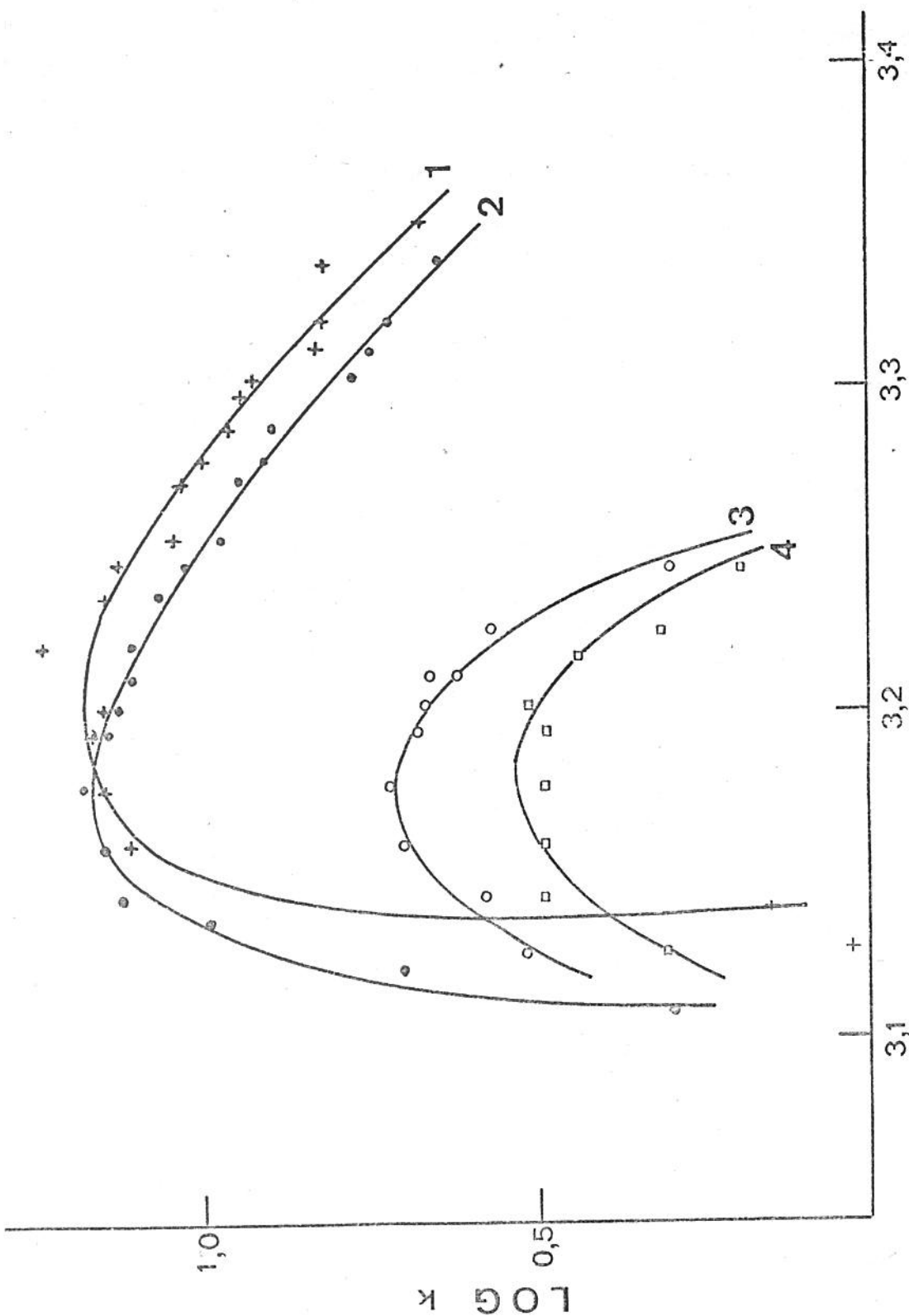
b) No meio BHI + 12% NaCl

- 1 - Para as duas variantes obteve-se menor velocidade específica de crescimento que no meio sem sal.
- 2 - A variante pigmentada apresentou valores de k superiores aos da variante não pigmentada na quase totalidade do intervalo de temperaturas.
- 3 - Obteve-se um decréscimo menos pronunciado que no meio BHI, nos valores de k para temperaturas superiores à ótima, para as duas variantes estudadas.

5 - Obtenção de variantes a partir das linhagens originais pigmentadas.

5.1 - Variantes espontâneas

Na obtenção de variantes espontâneas com pigmentação diferente da original, as colônias foram selecionadas de acordo à des



$1/T \times 10^3$

Figura 3: Gráfico de Arrhenius para S. aureus 50a e S. aureus 50b nos meios BHI e BHI + 12 % NaCl:

- (1) S. aureus 50b em meio BHI
- (2) S. aureus 50a em meio BHI
- (3) S. aureus 50a em meio BHI + 12 % NaCl
- (4) S. aureus 50b em meio BHI + 12 % NaCl

crição detalhada no Capítulo III. A esta categoria pertencem as variantes da linhagem Nº 50 denominadas: 50-1 a 50-13 e a Nº 50-38, sendo que as numeradas de 50-7 a 50-11, todas de cor manteiga, foram obtidas após o processo de congelamento e descongelamento. Não se observou um aumento na incidência de variantes por este último método, em relação aos valores obtidos pelo método de diluição e semeadura em placas, de modo que, as variantes 50-7 a 50-11 foram consideradas como variações espontâneas.

Todas as variantes das linhagens 85, 87, 89 e 113 estudadas foram espontâneas. Observou-se que a incidência de variantes espontâneas apigmentadas era variável, sendo menor que 0,3 % para as linhagens 50, 87, 89 e 113, e superior a 3 % para a linhagem 85.

5.2 - Variantes induzidas

5.2.1 - Variantes obtidas pela ação da NTG

As variantes foram selecionadas após a exposição à NTG por tempos de 15, 30, 45, 70 e 110 minutos, a partir de placas com meio BHI-agar + 10% de leite + 7% sal, das quais umas foram semeadas diretamente após tratamento e outras semeadas após 24 horas de cultivo submerso. Estas variantes foram denominadas com os números 50-16 a 50-37*. Nos primeiros 15 minutos de tratamento houve uma mortalidade de 99,99 % (figura 4), valor que se manteve praticamente constante para os tempos subsequentes. A incidência de variantes não pigmentadas foi aproximadamente 3 %, o que representa um aumento de, pelo menos dez vezes a in-

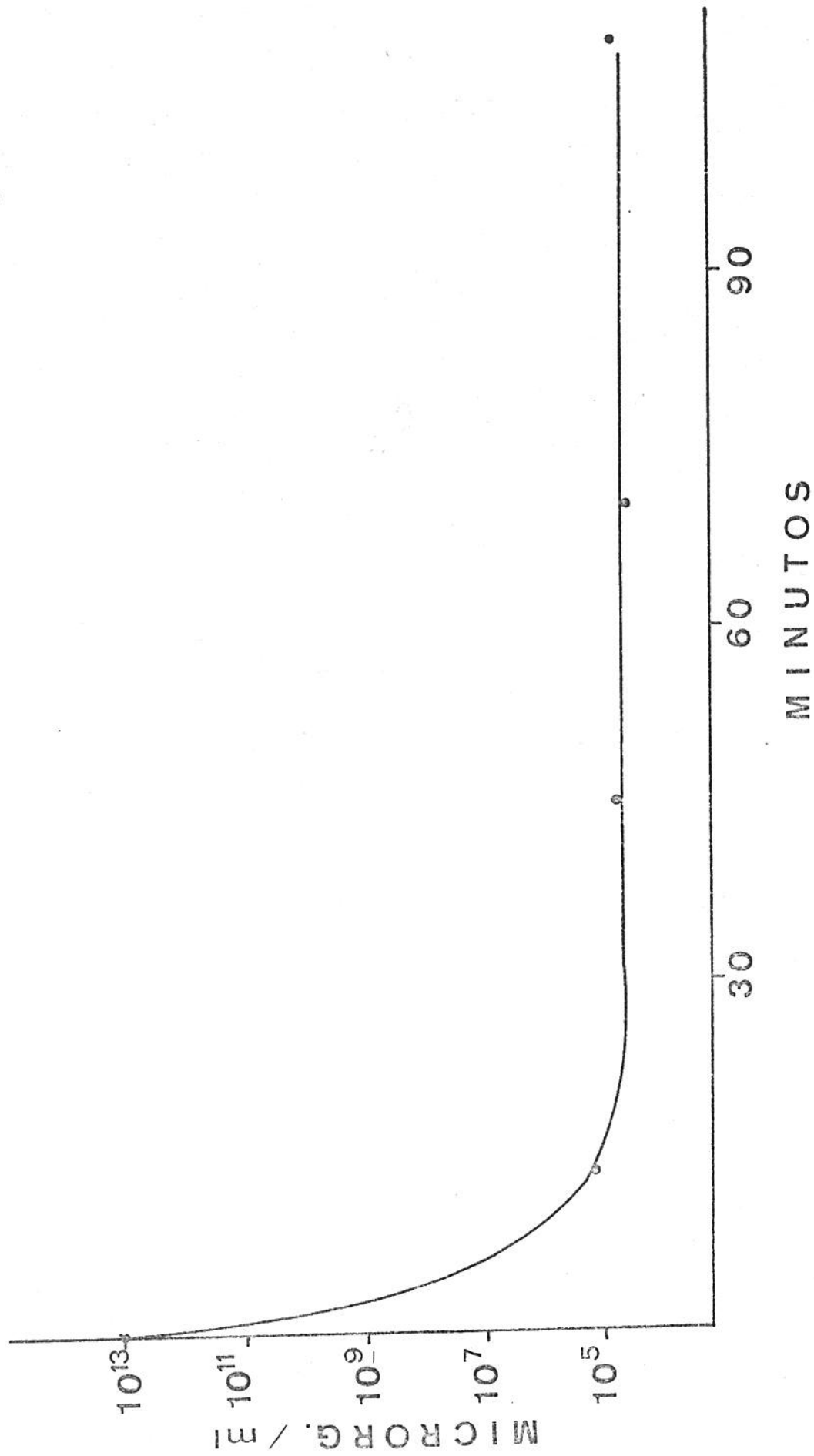


Figura 4: Curva de sobrevivência da linhagem S. aureus 50a,
à ação da NTG.

cidência observada para as variantes de natureza espontânea.

A exposição da variante apigmentada 50-2 à ação da NTG por tempos de 15, 30, 45, 60 e 90 minutos não deu lugar ao aparecimento de colônias pigmentadas, obtendo-se somente colônias com diferentes graus de transparência.

5.2.2 - Variantes obtidas pelo uso da luz ultravioleta

As variantes obtidas pela ação da luz ultravioleta, e semeadura em placas da suspensão bacteriana após 2, 4, 6, e 8 minutos de tratamento, foram denominadas com os números 50-37, 50-39, 50-40, 50-41 e 50-42.

Nos primeiros dois minutos do tratamento houve uma mortalidade de 99,99 % (figura 5), valor que se manteve praticamente constante para os tempos de 4, 6 e 8 minutos. O valor da incidência de aproximadamente 1 % das variantes não pigmentadas corresponde a uma taxa três vezes maior que a variação espontânea.

6 - Caracterização das linhagens originais e suas variantes

6.1 - Linhagens originais

Os resultados dos testes efetuados para a caracterização das linhagens pigmentadas originais de números 50, 85, 87, 89 e 113, figuram nos quadros Nº 3 - 7. Todas as amostras se comportaram como Staphylococcus aureus pigmentados, ou seja, possuíam

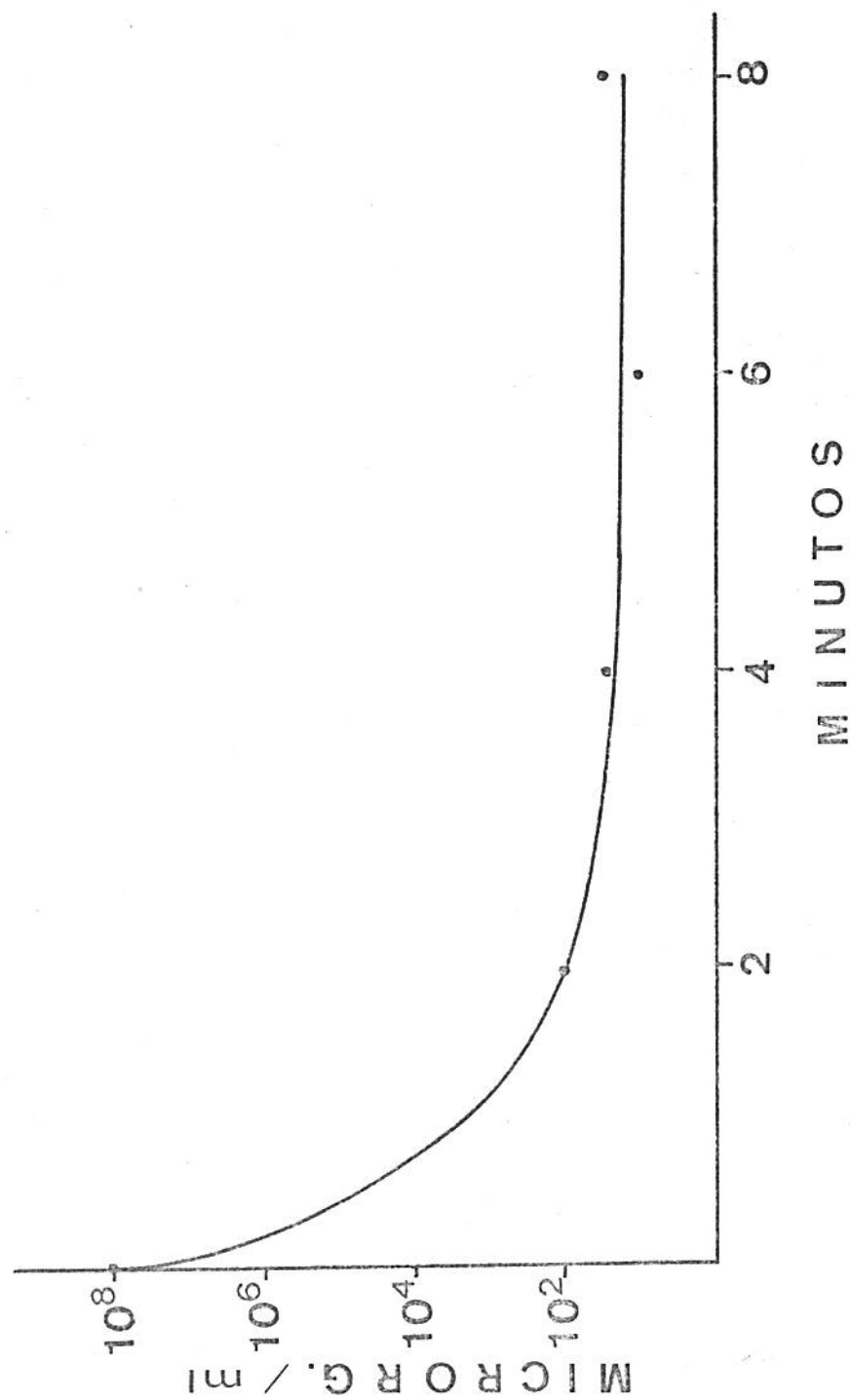


Figura 5: Curva de sobrevivência da linhagem S. aureus 50a, à ação da luz ultravioleta.

as seguintes características: presença das enzimas coagulase, DNase termo-resistente e hemolisina(s) e capacidade de utilizar os carboidratos manitol, lactose e maltose.

Elas diferiram nas seguintes características: 1) capacidade de produzir penicilinase, sendo a Nº 50 penicilinase negativa e as restantes positivas; 2) produção de enterotoxinas, sendo as linhagens 50, 85 e 87 não produtoras e as 89 e 113 produtoras de enterotoxina C e a linhagem 6-S produtora de enterotoxina B, e 3) na tipificação pelos bacteriófagos; o fagótipo para a linhagem Nº 50 foi 53/54/84/85/95; para as linhagens 85 e 89 foi 89/90/92; para a linhagem 87 foi o fagótipo Nº 86 e finalmente para a linhagem 6-S foi 47/53/54/76/77/83A/84/85.

6.2 - Variantes espontâneas e induzidas

Os resultados dos testes de caracterização destas variantes na produção de coagulase e DNase estão apresentados nos quadros 3-7.

As variantes da linhagem Nº 50 dividiram-se em dois grandes grupos: as que conservam a capacidade de produzir estas enzimas e as que a perderam. As variantes 50-4 e 50-5 foram obtidas de uma colônia sectoriada, a seção pigmentada 50-4 conservou as enzimas coagulase e DNase, enquanto que a seção não pigmentada, 50-5 perdeu-as. A variante 50-3, ligeiramente pigmentada, deu lugar, após novos plaqueamentos, a dois tipos de colônias, brancas e amarelas, denominadas respectivamente 50-3b e 50-3a, sendo ambas coagulase e DNase negativas. As linhagens 50-7 e 50-13 obti-

das pelo processo congelamento-descongelamento conservaram as duas características já mencionadas. Quanto a utilização de açúcares todas mantiveram a capacidade de crescimento nos diferentes açúcares, excetuando as Nº 50-1 e 50-2 que não cresceram no manitol e 50-5 e 50-6 que não cresceram na lactose.

Grande parte das variantes derivadas da linhagem Nº 50 conservaram a propriedade de produzir hemolisina β , sendo que as variantes: 50-17, 50-18, 50-19 e 50-20 também apresentaram hemolisina α ou γ . As variantes 50-11, 50-12 e 50-13 perderam a capacidade de produzir a enzima e as variantes 50-24 e 50-38 só apresentaram hemolisina α ou γ .

Da linhagem No. 85 (quadro 6) foram estudadas 7 variantes apigmentadas, todas coagulase, DNase e manitol negativas. As demais características estudadas como produção de hemolisina, penicilinase e utilização de lactose e maltose permaneceram inalteradas.

Das duas variantes da linhagem Nº 87 (quadro 7), uma conservou e a outra perdeu as enzimas coagulase, DNase e hemolisina, mantendo ambas a capacidade da utilização dos carboidratos lactose, maltose e manitol.

As duas variantes não pigmentadas da linhagem Nº 89 (quadro 7) conservaram as características da linhagem original exceto no que refere a produção de hemolisina. A linhagem original não era produtora, e as suas variantes produziram hemolisinas α e β respectivamente.

A linhagem Nº 113 e sua variante 113-1 possuíam as mesmas

propriedades. Entretanto, esta última apresentou produção aumentada de coagulase e DNase.

7 - Tipificação pelos bacteriófagos

O resultado da tipificação por bacteriófagos está apresentado nos quadros Nº 3-7. Observa-se que as variantes da linhagem Nº 50 apresentaram sensibilidade a dois fagos a mais que a linhagem original, exceto a variante Nº 50-7. A linhagem 6-S apresentou um fagótipo similar ao das variantes apigmentadas da linhagem Nº 50.

As variantes da linhagem Nº 85 não foram tipificadas por bacteriófagos por serem todas coagulase negativas. A linhagem Nº 87 e suas variantes foram lisadas pelo fago Nº 86. As variantes da linhagem Nº 89 não reagiram as concentrações de fagos utilizadas, assim como a linhagem 113 e suas variantes.

Quadro 3: Caracterização da linhagem N° 50 e suas variantes espontâneas

Variante N°	50	50-1	50-2	50-3a	50-3b	50-4	50-5	50-6
Côr da colônia	amarelo laranja	branca	branca	amarelo	branca	manteiga	branca	manteiga
Coagulase	+	-	-	-	-	+	-	-
DNase	+	-	-	-	-	+	-	-
Hemolisina	β	β	β	β	β	β	β	β
Penicilina	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetoina	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	-	-	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	-	-	+	+	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Fagotipagem	53/54/84/ 85/95	Não reagiu				47/53/54/77/ 84/85/95		
Enterotoxina	-	-	-			-		

Quadro 3: (Continuação)

Variante Nº	50-7	50-8	50-9	50-10	50-11	50-12	50-13	50-38
Côr da colônia	branca	manteiga	manteiga	manteiga	manteiga	branca	limão	manteiga
Coagulase	+	+	+	+	+	+	+	+
DNase	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemolisina	β	β	β	β	-	-	-	α
Penicilina	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetoina	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Fagotipagem	53/54/77/ 84/85/95	54/84/95	47/53/54/ 77/84/85/ 95	47/53/54/ 77/84/85/ 95	47/53/54/ 77/84/85/ 95	47/53/54/ 77/84/85/ 95	47/53/54/ 77/84/85/ 95	47/53/54/ 75/77/84/ 85/95
Enterotoxina	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 4: Caracterização das variantes da linhagem N° 50 obtidas pela ação da NTG.

Variante N°	50-16	50-17	50-18	50-19	50-20	50-21	50-22	50-23
Côr da colônia	manteiga	branco	branco	manteiga	branco	manteiga	branco	branco
Coagulase	+	+	-	+	+	+	+	+
DNase	+	+	-	+	+	+	+	+
Hemolisina	β	$\beta\alpha$	$\beta\alpha$	$\beta\alpha$	$\beta\alpha$	β	β	β
penicilinas	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetoina	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Fagotipagem	47/53/54/ 77/84/85/ 95	47/53/54/ 84/85/95/		53/54/77/ 84/85/95	47/53/54/ 77/84/85/ 95	47/53/54 77/84/85 95	47/53/54 77/84/85 95	42E/47/53 54/77/84 85/95
Enterotoxina								

Quadro 4: (Continuação)

Variante Nº	50-24	50-25	50-26	50-27	50-28	50-29	50-30	50-31
Côr da colônia	branco	branco	branco	branco	branco	branco (setoriada)	branco	branco
Coagulase	+	+	+	+	+	+	+	+
DNAse	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemolisina	α	β	β	β	β	β	β	β
Penicilina	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetoina	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	-	+	+	+	-	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Fagotipagem	81/42E/47 53/54/75 77/84/85 95	29/81/42E 47/53/54 75/77/84 85/95	47/53/54 77/84/85 95	47/53/54 77/84/85 95	81/42E/47 53/54/75 77/84/85 95	47/53/54 77/84/85 95	47/53/54 77/84/85 95	47/53/54 77/84/85 95
Enterotoxina								

Quadro 4: (Continuação)

Variante Nº	50-32	50-33	50-34	50-35	50-36	50-37*
Côr da colônia	branco	branco	branco	branco	branco	limão
Coagulase	+	+	+	+	+	+
DNase	+	+	+	+	+	+
Hemolisina	β	β	β	β	β	β
Penicilinas	-	-	-	-	-	-
Acetoina	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Fagotipagem	42E/47/53 54/77/84 85/95	42E/47/53 54/75/77 84/85/95	42E/47/53 54/77/84 85/95	47/53/54 84/85/95		53/95
Enterotoxina						

Quadro 5: Caracterização das variantes da linhagem N° 50 obtidas
pela ação da luz ultravioleta

Variante N°	50-37	50-39	50-40	50-41	50-42
Côr da colônia	branca	branca	branca	branca	amarelo
Coagulase	+	-	-	-	-
DNase	+	-	-	-	-
Hemolisina	β	β	β	β	β
Penicilinase	-	-	-	-	-
Acetoina	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	
Lactose	+	+	+	-	
Maltose	+	+	+	+	
Fagotipagem	53/54/85/95				
Enterotoxina	-		-		

Quadro 6: Caracterização da linhagem N° 85 e suas variantes espontâneas.

Variante N°	85	85-1	85-2	85-3	85-4	85-5	85-6	85-7
Côr da colônia	amarelo laranja	branco	branco	branco	branco	branco	branco	branco
Coagulase	+	-	-	-	-	-	-	-
DNAse	+	-	-	-	-	-	-	-
Hemolisina	$\alpha\beta$	β	β	β	$\beta\alpha$	β	β	β
Penicilinas	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetoina	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Fagotipagem	89/90/92							
Enterotoxina	-							

Quadro 7: Caracterização das linhagens de S. aureus 87, 89 e 113 e suas variantes espontâneas, e da linhagem S-6 (FRI)

Variante Nº	87	87-1	87-2	89	89-1	89-2	113	113-1	S-6
Côr da colônia	amarelo	branco	manteiga	amarelo	branco	branco	amarelo	branco	branco
Coagulase	+	-	+	+	+	+	+	+	+
DNase	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Hemolisina	β	-	β	-	α	β	$\alpha\beta$	$\alpha\beta$	α
Penicilinase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetoina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fagotipagem	86	86	86	89/90/92	Não reagiu	Não reagiu	Não reagiu	não reagiu	47/53/54/ 75/77/83A/ 84/85
Enterotoxina	-			C	C	C	C	C	B

Quadro 8: Relação de porcentagens de incidência de variantes espontâneas derivadas das linhagens de S. aureus 50, 85, 87, 89 e 113 e da perda ou conservação das enzimas coagulase, DNase e hemolisina.

Linhagem	Incidência %	Nº estudo	DNase conserva	DNase perde	Coagulase conserva	Coagulase perde	Hemolisina β conserva	Hemolisina β perde	Hemolisina α adquire
50	0,3	7 100%	2 30%	5 70%	2 30%	5 70%	6 85%	1 14%	1 14%
85	3,0	7 100%	0 0%	7 100%	0 0%	7 100%	7 100%	0 0%	1 14%
87	0,3	2 100%	1 50%	1 50%	1 50%	1 50%	1 50%	1 50%	0 0%
89	0,3	2 100%	2 100%	0 0%	2 100%	0 0%	2 100%	0 0%	2 100%
113	0,3	1 100%	1 100%	0 0%	1 100%	0 0%	1 100%	0 0%	0 0%

Quadro 9: Relação de porcentagens de incidência de variantes não pigmentadas derivadas da linhagem N° 50 espontâneas e induzidas, e da perda ou conservação das enzimas coagulase, DNase e hemolisina.

Variantes	Incidência %	Nº estudo	DNase conserva	DNase perde	Coagulase conserva	Coagulase perde	Hemolisina β conserva	Hemolisina β perde	Hemolisina α adquire
Espontâneas	0,3	7 100%	2 30%	5 70%	2 30%	5 70%	6 85%	1 14%	1 14%
Induzidas com NTG	3,0	22 100%	22 100%	0 0%	22 100%	0 0%	22 100%	0 0%	5 20%
Induzidas com UV	1,0	5 100%	1 20%	4 80%	1 20%	4 80%	1 20%	4 80%	0 0%
Induzidas por congelamento	0,3	6 100%	6 100%	0 0%	6 100%	0 0%	5 80%	1 20%	0 0%

V - DISCUSSÃO

1 - Estudo dos meios utilizados na produção de pigmento

Neste estudo os meios com creme de leite, e com leite e NaCl, produziram níveis de pigmentação mais altos. Estas observações confirmaram os resultados de O'Connor et al. (21) que trabalharam com o meio agar-creme. O poder de assimilação de lipidios pelos estafilococos pode ter certa ação no ciclo do ácido tricarboxílico facilitando a síntese de pigmentos carotenoides em linhagens já possuidoras desta característica.

A combinação leite e sal não foi encontrada na literatura consultada. De acordo com os resultados obtidos, este é um meio muito adequado para a observação de pigmento, com propriedades indicadoras e seletivas.

2 - Estudo da influência da concentração salina e do tempo de conservação a 10 °C na produção de pigmento

Foi observado que o nível de pigmentação variou entre diferentes concentrações de NaCl com o tempo de conservação. Há muito tempo o NaCl tem sido utilizado na preparação de meios para estafilococos, porém, não foram encontrados na literatura consultada estudos sobre seu efeito no nível de pigmentação.

Uma outra propriedade do NaCl é seu efeito inibidor sobre o crescimento do estafilococo, que é marcante para concentrações acima de 12%. Baseado nesta propriedade, pode-se explicar o deslocamento do nível de pigmentação para concentrações crescentes

do sal com o tempo de conservação. Nas concentrações salinas com efeito inibidor do desenvolvimento de microrganismos haveria diminuição da produção de pigmento, e como este não é difusível continuaria a se acumular. Nas concentrações salinas não inibidoras haveria produção de pigmento não restrita, mas nesse metabolismo ativo poderia produzir-se um envelhecimento rápido das colônias que afetaria o nível e a qualidade do pigmento.

O'Connor et al. (21) observaram que o desenvolvimento mais rápido do pigmento ocorre a 37 °C com 48 horas de incubação. Após este tempo, o nível de pigmentação vai decrescendo sensivelmente. Por outro lado, Wilson e Nunez (35) medindo a quantidade de pigmento produzida por grama de microrganismo observaram que a formação de pigmento mais rápida ocorre a 37 °C. Entretanto, em temperaturas inferiores haveria maior produção de pigmento, porém necessitando de tempos maiores de incubação.

3 - Cinética de crescimento

O estudo da cinética de crescimento das variantes S. 50a e S. 50b mostrou crescimento mais intenso no meio sem NaCl do que no meio contendo 12% de sal, conforme ao esperado. A seleção da concentração salina de 12% foi determinada baseada em trabalhos anteriores, feitos com a variedade pigmentada da linhagem Nº 50 (Yokoya (36)) cujos resultados indicaram um declínio pronunciado na velocidade de crescimento para concentrações de sal superiores a esse valor.

No meio sem sal, a variante não pigmentada obteve cresci-

mento ligeiramente mais rápido, às temperaturas inferiores ou na de crescimento ótimo, 38,3 °C. Este resultado está de acordo com os dados obtidos por Grinsted e Lacey (11) utilizando cultura mista de duas variantes, pigmentada e não pigmentada, incubadas a 38 °C.

Nas temperaturas superiores o crescimento da variante pigmentada foi maior, mostrando um valor ótimo à temperatura de 43,5 °C.

A presença de sal no meio não afetou os valores de temperatura ótima para ambas as variantes, mostrando aproximadamente $38,3 \pm 1,0$ °C para a não pigmentada e $43,0 \pm 1,9$ °C para a pigmentada. Isto mostra que a variante pigmentada apresenta melhor adaptação às temperaturas mais elevadas.

As curvas de Arrhenius para as duas variantes no meio com sal indicaram crescimento mais rápido da variante pigmentada em todas as temperaturas estudadas, com exceção do extremo inferior, onde a velocidade de crescimento foi idêntica para as duas variantes. Isto indica que a variante pigmentada é mais tolerante ao sal.

Essa melhor adaptação às temperaturas mais elevadas para a variante pigmentada pode ser explicada em termos do nicho ecológico, em que o estafilococo pigmentado existe: pele, mucosas, abscessos e outras infecções do homem e animais. Segundo os dados de Grinsted e Lacey (11) de 631 estafilococos coagulase positivos por eles isolados de diferentes fontes hospitalares e não hospitalares, somente 7 % eram não pigmentadas.

Os estafilococos não pigmentados na sua maioria saprófitas existem principalmente na superfície externa do corpo e portanto estão submetidos a temperaturas inferiores.

O sal tem sido utilizado como agente seletivo no isolamento do estafilococo por longo tempo. O resultado aqui apresentado teria implicações no uso de meio com sal para esse fim, uma vez que isso resulta na seleção, a priori, de estafilococos pigmentados em detrimento dos não pigmentados existentes na fonte.

Não se tem achado uma explicação direta da resistência ao sal pela presença de pigmento. Sabe-se porém que os estafilococos pigmentados são em geral mais resistentes que os não pigmentados agentes físicos e químicos. Assim foi constatada a maior resistência aos efeitos da foto-oxidação, à dessecação e à ação do ácido linoléico. Esses resultados indicam uma maior resistência geral dos organismos pigmentados.

4 - Obtenção de variantes e sua caracterização

No estudo de variantes não pigmentadas obtidas espontaneamente observamos que a incidência foi, na maioria dos casos, inferior a 0,3 %, e pode ou não estar acompanhada de perda de outras propriedades.

A linhagem Nº 85 apresentou incidência dez vezes maior (superior a 3 %), tendo como característica a uniformidade no comportamento de suas variantes. Todas elas perderam a capacidade de produzir coagulase, DNase e de utilizar manitol. Este resultado é significativo desde que os derivados desta linhagem perderam as

características de Staphylococcus aureus, passando a corresponder às propriedades de Staphylococcus epidermidis. Isso nos leva a considerar a possibilidade do S. epidermidis ser apenas uma variante do S. aureus surgida espontaneamente. Entretanto, esse comportamento não é geral; algumas linhagens, como a Nº 50 apresentaram variantes com perda apenas de pigmento e outras com perda simultânea das características coagulase e DNase.

A ação dos agentes mutagênicos nas linhagens originais pigmentadas, resultou na formação de variantes não pigmentadas. Deve-se salientar a uniformidade no comportamento das variantes obtidas pela ação da NTG. Das 22 variantes apigmentadas testadas, nenhuma perdeu as características coagulase e DNase.

Com o intuito de testar a hipótese de que variantes não pigmentadas são incapazes de reverter para pigmentadas, segundo Altenberg (2), a variante apigmentada 50-2 foi submetida à ação da NTG. Não foi possível obter nenhuma forma pigmentada, mesmo a diferentes tempos de exposição. Também não houve reversão para variantes pigmentadas durante sua conservação.

Quanto a presença ou ausência das enzimas coagulase e DNase termo-resistente houve 100 % de correlação entre ambas, o que confirma observações de outros pesquisadores. Isso indica indiretamente uma localização muito próxima dos gens que codificam estas duas propriedades. Por outro lado, os gens codificadores de pigmento aparentemente não tem o mesmo grau de proximidade. A possibilidade do pigmento estar codificado por elementos extra-cromossômicos é amplamente discutida por Grinsted e Lacey (11) e La

cey (15).

Duas características permaneceram constantes com a perda de pigmento em todos os casos: a capacidade de produzir penicilina_{se} pelas variantes de linhagens originariamente penicilina_{se} positivas, e, segundo os dados incompletos que possuímos, a capacidade de produzir enterotoxina.

5 - Tipificação pelos bacteriófagos

O estudo da linhagem Nº 50 e seus derivados mostrou que as variantes não pigmentadas coagulase positivas são sensíveis a dois bacteriófagos a mais que a linhagem original. Este resultado foi constante para todas as variantes da linhagem Nº 50 testadas. Não obstante, outras linhagens e suas variantes mostraram o mesmo fagótipo. Grinsted e Lacey (11) trabalhando com duas variantes pigmentadas e não pigmentadas, de quatro diferentes linhagens, não acharam diferença as no fagótipo das mesmas.

De modo geral, podemos dizer que os resultados da tipificação por bacteriófagos indicaram que as diferenças entre as variantes não alteraram o fagótipo geral. Além disso, estas variantes não tem sofrido alterações muito profundas e que sem dúvida não se trata de contaminantes.

Tanto os resultados da tipificação por bacteriófagos como os dos testes bioquímicos realizados não foram suficientes para o esclarecimento da natureza genética de pigmento. Assim sendo, os experimentos possíveis a serem realizados nesse sentido seriam entre outros, a utilização de agentes específicos eliminadores de

plasmídeo: transformação e transdução. A ultracentrifugação poderia ser utilizada como uma tentativa de separação de elementos extracromossômicos eventualmente envolvidos na produção de pigmento em S. aureus.

VI - CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos podemos concluir que:

- 1 - A perda de pigmento pelo Staphylococcus aureus é acompanhada de outras mudanças bioquímicas e fisiológicas, como a capacidade de utilizar certos carboidratos.
- 2 - Não se obteve reversão para a forma pigmentada a partir de variantes não pigmentadas, nem espontaneamente, nem pela ação do agente mutagênico NTG.
- 3 - A capacidade de produzir enzimas coagulase e DNase termo-resistente pode ou não desaparecer junto com pigmento.
- 4 - As variantes pigmentadas apresentam maior resistência à temperatura alta e à presença de sal.
- 5 - Para certas linhagens há alterações constantes no fagótipo dos derivados apigmentados.
- 6 - Para as linhagens testadas e suas variantes não foi encontrada correlação entre a presença da enzima penicilinase e a perda de pigmento.
- 7 - As variantes espontâneas, apigmentadas, obtidas a partir da linhagem Nº 50, com uma incidência menor do que 0,3 %, não são semelhantes entre si no que concerne a suas propriedades bioquímicas. Entretanto, as obtidas a partir da linhagem 85, com incidência maior que 3 %, apresentam o mesmo comportamento nos testes realizados.

8 - Todas as variantes obtidas pela ação da NTG apresentam o mesmo comportamento, ao passo que as obtidas pela ação da luz ultravioleta apresentam comportamento diferente.

As conclusões 4 a 8 são originais, não tendo sido verificado na literatura consultada nenhum comentário a respeito dessas características. As demais conclusões concordam com os resultados encontrados por outros pesquisadores.

Estas conclusões são válidas para as linhagens utilizadas nesta pesquisa. Qualquer generalização em relação a estas deverá ser considerada com precaução.

VII - BIBLIOGRAFIA

1. Abo-Elnaga, T.; Kandler, D. 1965. Zur Charakterisierung der in milch verbreiteten Staphylokokken. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. abt. I Orig. 196: 438 - 451
2. Altenbern, R. A. 1966. Genetic studies of pigmentation of Staphylococcus aureus. Can. J. Microbiol. 13: 389 - 395
3. Baird-Parker, A. C. 1968. Methods for classifying Staphylococci and Micrococci. Identification Methods for Microbiologists. Ed. B.M. Gibbs; F.A. Skinner. London - Academic Press
4. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 1957. 7a. ed. Ed. Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith, N.R. Baltimore, U.S.A. The William and Wilkins Co.
5. _____ 1974. 8va. ed. Ed. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. Baltimore, U.S.A. The William and Wilkins Co.
6. Chopra, I.; Bennet, P.M. and Lacey, R.W. 1973. A variety of Staphylococcal plasmids present as Multiple Copies. J. Gen. Microb. 79: 343 - 345.
7. Crisley, F.D., Angelotti, R. and Foter, M.T. 1964. Multiplication of Staphylococcus aureus in Synthetic cream fillings and pies. Public Health Rept. (U.S.) 79: 369 - 382
8. Doudoroff, M. 1936. Association of Characters among Dissociates from Staphylococcus aureus. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 34: 216 - 217

9. Elek, S. D. and Levy, E. 1950. Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic Staphylococci. J. Pathol. Bacteriol. 62: 541-554
10. Evans, J. B.; Bradford, W. L. and Niven, C. F. 1955 Comments concerning the taxonomy of the genera Micrococcus and Staphylococcus. International Bull. Bacteriol. Nomen. Tax. 5: 61-66
11. Grinsted, J. and Lacey, R. W. 1973. Ecological and genetic implications of pigmentation in Staphylococcus aureus. J. Gen. Microb. 75: 259-267.
12. Hanus, F. J.; Morita, R. Y. 1968. Significance of the temperature characteristic of growth. J. Bacteriol. 95: 736 - 737.
13. Holbrook, R.; Anderson, J. M. and Baird-Parker, A. C. 1969. The performance of a stable version of Baird-Parker's medium for isolating Staphylococcus aureus. J. Appl. Bacteriol. 32: 187 - 192.
14. Kumisawa R.; Stanier, R. Y. 1958. Studies on the role of carotenoid pigments in a chemoterotrophic bacterium, Corynebacterium poinsettiae. Archiv fur Mikrobiologie 31: 146-156
15. Lacey, R. W. 1975. Antibiotic resistance plasmids of Staphylococcus aureus and their clinical importance. Bact. Reviews 39: 1-32
16. Lachica, R.U. V.; Genigeorgis C. and Hoeprich, P. D. 1971.

Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity 21: 585-587

17. Lerman, L. S. 1962. The structure of the DNA acridine complex. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 49: 94-104.
18. Mah, R. A.; Fung, D. Y. C. and Morse, S. A. 1967. Nutritional requirements of *Staphylococcus aureus* S-6. Appl. Microbiol. 15: 866-870
19. Michaelis, L. and Granick, S. 1945. Metachromasy of basic dye stuffs. J. Amer. Chem. Soc. 67: 1212-1219
20. Nara, T.; Misawa, M.; Okachi, R. and Yamamoto M. 1971. Enzymatic synthesis of D(-) - - aminobenzylpenicillin, Part I. Selection of penicillin-acylase producing bacteria. Agr. Biol. Chem. 35: 1676-1682
21. O'Connor, J. J.; Willis, A. T. and Smith, J. A. 1966. Pigmentation of Staphylococcus aureus. J. Pathol. Bacteriol. 92:585-588
22. Parker, M. T. 1962. Phagetyping and epidemiology of Staphylococcus aureus infection. J. Appl. Bacteriol. 25: 389-402
23. Pinner, J. and Voldrich, M. 1932. Derivation of Staphylococcus albus, citrens and rosens from Staphylococcus aureus. J. Infect Diseases 50: 185-202
24. Richardson, G. M. 1936. The nutrition of Staphylococcus aureus. Necessity for uracil in anaerobic growth. Biochem. J. 30: 2184 - 2190
25. Rosenblum, E. D. and Jackson, J. L. 1959. Mixtures of coagul-

- ase-positive Staphylococci and strain variation in specimens from clinical sources. J. Lab. Clin. Med. 53: 247-252
26. Scott, W. J. 1953. Water relations of Micrococcus pyogenes var. aureus at 30 °C. Australian J. Exptal. Biol. Med. Sci. 6: 549-564
 27. Servin-Massieu, M. 1961. Spontaneous appearance of sectorial colonies in Staphylococcus aureus cultures. J. Bacteriol. 82: 316-317
 28. Shaw, C.; Stitt, J. M. and Cowan, S. T. 1951. Staphylococci and their classification. J. Gen. Microbiol. 5: 1010-1023
 29. Stewart, G. T. 1965. The lipases and pigments of Staphylococci. Ann. N.Y. Acad. Sciences 128: 132-151
 30. Suzue, G. and Tanaka, S. 1959. Carotenogenesis and resistance of Micrococcus pyogenes to tetracyclines. Science 129: 1359-1360
 31. Wentworth, B. B. 1963. Bacteriophage typing of the Staphylococci. Bacteriol. Rev. 27: 253-272
 32. Willis, A. T., O'Connor J. J. and Smith, J. A. 1966. Some observations on Staphylococcal pigmentation. Nature 210: 653-654
 33. Willis, A. T.; Smith, J. A. and O'Connor J. J. 1966. Properties of some epidemic strains of Staphylococcus aureus. J. Pathol. Bacteriol. 92: 345-358
 34. Willis, A. T. and Turner G. C. 1962. Staphylococcal lipolysis and pigmentation. J. Pathol. Bacteriol. 84: 337-347

35. Wilson, T. E.; Nunez, G. G. 1965. Factors influencing pigment production by Staphylococcus aureus. Texas Rept. Biol. Med. 23: 147
36. Yokoya, F. 1974. Efeito da concentração salina sobre o crescimento de Staphylococcus aureus. VI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Caracas, Venezuela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram na realização deste trabalho:

Ao Dr. Fumio Yokoya pela sua orientação.

Ao Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro pelo seu encorajamento e valiosa colaboração na discussão e redação.

Ao Dr. Brooks Naylor pela contribuição na discussão de alguns tópicos.

Ao Dr. Young Park e a Demetrio Edgar Maranczenbaum Aguilera pela sugestão de algumas técnicas empregadas nesta pesquisa.

Ao Dr. Merlin S. Bergdoll, Sara Gould e Ruth Robins pela assistência técnica na detecção da enterotoxina.

Ao Dr. Carlos Solé-Vernín e sua equipe de trabalho pela assistência técnica na fagotipagem dos microrganismos.

Ao nosso pessoal do laboratório, em especial a Srta. Rosa Maria Tabárez Andrasso pela ajuda e boa disposição em todos os momentos.