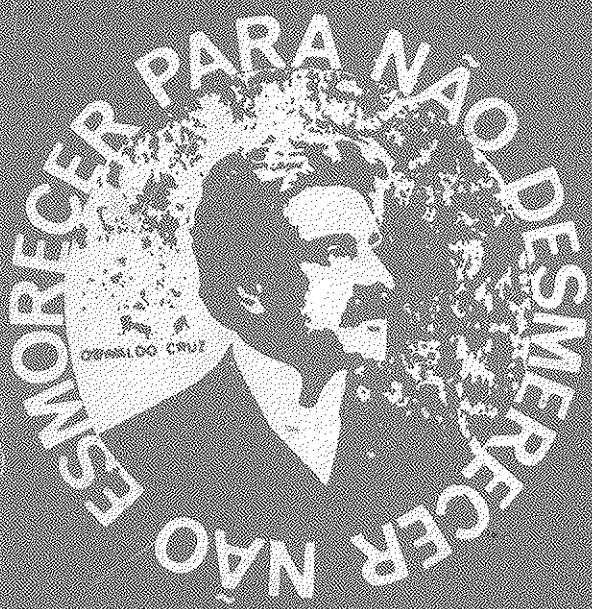


Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

volume 15 número 1 jan.-mar. 1984

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 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, unidades internacionais Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de nanogramas (n), e pico (p), ao invés de milímicro ($m\mu$); micromicro ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm); milhão (ppm) devem ser expressos como microrganismos por milímetros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro ($\mu l/litro$). Partes da seção reserver-se 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 nossa nomenclatura apresentada no "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (8^a ed., 1974) obedecida. Se o Autor divergir dessa entre parênteses, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Bergey deverá ser mencionada. 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, em espaço duplo ou triplo, deixando-se o mínimo de 3 cm de margens laterais, superior e inferior. Títulos de capítulos de primeira ordem e subcapítulos devem ser colocados junto à margem esquerda do manuscrito, incluídos essencialmente pela ordem: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências Bibliográficas.

A página título deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, 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. 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 um ponto e vírgula e o último por &. Na seção Referências Bibliográficas as citações devem ser por ordem alfabética de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas sequencialmente. Os artigos em periódicos devem ser citados na secção 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 seção correspondente.

ILUSTRAÇÕES — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. A traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. As fotografias de ilustrações pressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com reticulas devem ser feitas em papel brilhante, com contrastes adequado para a reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos dispor ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Sempre que houver escala de aumento de rodapé, etc. sob TABELAS. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

NOTA 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
São Paulo — Brasil

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

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

Diretor Associado Flávio Alterthum
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: 2 ORTN's para o Brasil: US\$ 25.00 (via marítima) ou US\$ 30.00 (via aérea) 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: US\$ 25.00 (surface mail) or US\$ 30.00 (air mail). Checks for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Director's office.

Impressão Gráfica Editora Hamburg Ltda.

Pertence à:
REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cid. Universitária - USP
05508-900 — São Paulo/SP

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria	Presidente João S. Furtado Instituto de Botânica Caixa Postal 4005 01000 São Paulo SP	Secretário Geral Maria Therezinha Martins CETESB Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345 05459 São Paulo SP
	Vice-Presidente Paulo Pinto Gontijo Filho Instituto de Microbiologia UFRJ Centro de Ciências da Saúde Bloco I — Ilha do Fundão 20000 Rio de Janeiro RJ	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 agrupar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio e fazer aproximação com entidades que visem objetivos semelhantes.
Organiza, a cada dois anos, 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.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

A Sociedade Brasileira de Microbiologia recomenda que seus associados prestigiem os sócios patrocinadores da Revista de Microbiologia:

Biolab-Mérieux Produtos para Laboratórios Ltda.
Coca-Cola Indústrias Ltda.

Companhia Industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares
Eli Lily do Brasil Ltda.

Embrabio - Empresa Brasileira de Biotecnologia Ltda.
Indústrias Químicas e Farmacêuticas Schering S.A.
Merck, Sharp & Dohme Ind. Quim. Farmacêutica Ltda.
Rhodia S.A.

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
Dept. de Microbiologia - ICB II - USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Cid. Universitária
CEP 05508-900 - São Paulo - SP - BRASIL
Site: www.revmicro.cjb.net

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 15 JANEIRO-MARÇO 1984 NÚMERO 1
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 15(1)

	CONTEÚDO	CONTENTS
Saxena, J.	1	Sistemas de testes "in vitro" para levantamento de mutagenicidade por produtos químicos ambientais "In vitro" test systems for mutagenicity screening of environmental chemicals
Coelho, M. do S.L.; Guimarães, W.V.; Borges, A.C.; Silva, D.O. & Araújo, E.F. de	17	Sobrevivência de <i>Salmonella</i> em carne bovina moída armazenada em baixas temperaturas <i>Survival of Salmonella in ground beef under low storage temperatures</i>
Oliveira, T. de J.G.	24	Adaptação de métodos clássicos de análise de penicilinas à cefazolina <i>Adaptation of classic methods for penicillins analysis to cephazoline</i>
Fava Netto, C.; Schalch, A.L de & Arruda, C.	27	Durabilidade do antígeno polissacarídeo de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> <i>Viability of the polysaccharidic antigen of P. brasiliensis</i>
Martinez, M.B. & Moura, R.A. de A.	33	<i>Yersinia enterocolitica</i> em fezes de crianças com diarréia aguda <i>Yersinia enterocolitica in children with acute diarrhoeae</i>
Benchetrit, L.C.; Avelino, C.C. & Oliveira, C.M. de	35	Sorotipos e hialuronidase extracelular em estreptococos do grupo A <i>Serotypes and extracellular hyaluronidase of group A streptococci</i>
Informação Técnico-Científica SBM	39	

"IN VITRO" TEST SYSTEMS FOR MUTAGENICITY SCREENING OF ENVIRONMENTAL CHEMICALS

Jitendra Saxena

U.S. Environmental Protection Agency
Washington, D.C.
USA

Introduction

Industrialization of our civilization has resulted in an increased use and subsequent contamination of our environment with a wide variety of chemicals. It has been estimated that in the U.S. alone there are about 70,000 chemicals in commercial use and that 700 to 3000 new chemicals are introduced in the market each year (7).

The spectrum of chemical burden that humans are subjected is very broad, and can include use categories such as food and feed additives, pesticides, drugs and industrial chemicals (including their trace synthetic and/or degradation impurities) in various forms including solids, liquids, suspensions, dusts and aerosols. Potential toxicants can enter the environment through air, water and soil, as well as entering directly or indirectly into food.

One striking feature of the chemical industry during the past two decades has been the enormous growth in the production of organic chemicals. For example, in 1950, the world production totalled only approximately 7 million tons. By 1970 it had grown to 63 million tons and it is estimated that in 1985 it will total approximately 150 million tons (8). At present 20 million tons of manufactured organic chemicals may enter the environment annually according to Iliff (8).

The hazards posed to man and his environment by chemicals are now widely appreciated. For example, the U.S. Toxic Substances Control Act requires premarket screening of all new chemical substances and all new uses of existing chemicals. The presence of chemicals in drinking water in the U.S. is being regulated under the Safe Drinking Water Act. The Occupational Safety and Health Administration in the U.S. is involved in controlling exposure to chemicals in occupational settings.

Among all environmental and human health effects, mutagenic effects are regarded to be of special concern. There are several reasons for this. One of them is that an increase in the mutation rate in the human germ line (egg or sperm) may cause an increased incidence of genetic diseases in future generations. The second reason is that mutation in somatic cells (cells other than germ cells) may lead to an increased cancer incidence. There is increasing evidence that cancer is preceded by a mutagenic event.

Therefore, the induction of mutations both in germ cells and in somatic cells has serious implications for human health.

Relation between mutagenicity and carcinogenicity

Much experimental and theoretical evidence suggest a close relationship between mutagenicity and carcinogenicity which makes it possible to deal with the carcinogenic and mutagenic properties of chemicals in the same context. A significant body of evidence associates one or more critical steps in cancer induction with changes in cellular genetics. Figure 1 presents a hypothetical scheme of the various steps involved in mutagenic and carcinogenic events.

Specifically, the lines of evidence supporting a relationship between these toxicological end points are as follows:

- Tumors have been shown to be of monoclonal origin that is originating from one single cell. This is expected for a mutational event;

b. Transformed malignant cells have phenotypic properties which are different from their non-transformed precursor cells. This is evidence that a genotypic change has produced a new phenotype;

c. As phenotypic properties are passed on to all progeny cells, this suggesting that malignancy is associated with hereditary change in the cell most possibly interaction with DNA;

d. There are two different categories of chemical mutagens and carcinogens (1) direct acting mutagens and carcinogens, and (2) mutagens and carcinogens which do not become biologically active until they are metabolized in an animal generally by the liver; such chemicals are referred to as pro-mutagens and procarcinogens. For several procarcinogens the

active metabolites have been established and have been shown to be the same molecules which are genetically active;

e. Ames & col. (1) have calculated the carcinogenic potency for many chemicals from the published animal cancer data. Carcinogenic potency is defined as the daily dose which will give half of the experimental animals cancer in a lifetime feeding study. The dose has been found to vary by more than a million fold. A similar range has been found in mutagenic potency in the *Salmonella* (Table 1).

f. The next piece of evidence for a relationship between mutagenicity and carcinogenicity comes from comparing the mutagenic potential of a broad range of chemicals with their carcinogenic activity.

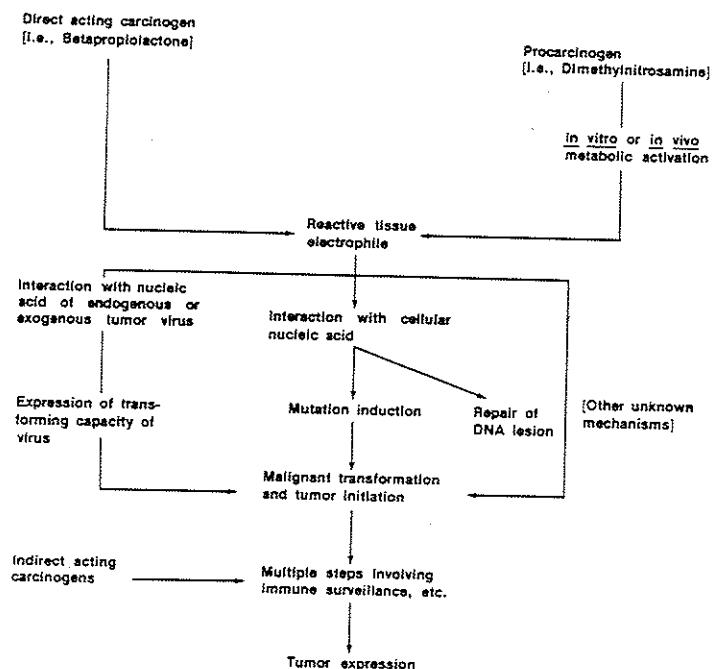
In this study, compounds were selected which were both carcinogenic in rodent assay and mutagenic in *Salmonella typhimurium*. Mutagenic potency was calculated as the reciprocal of ug test chemical required to give rise to 100 revertants. Carcinogenic potency here was defined as the dose in mg/kg body weight/day which caused 50% incidence of induced cancer. A linear relationship between mutagenic and carcinogenic potency strongly suggests a relationship between these toxicological endpoints, at least for the compounds studied (Figure 2).

Test methods for evaluation of chemicals for mutagenicity/carcinogenicity

General discussion - If we are to limit and/or eliminate exposure to environmental mutagens and carcinogens, one of the first things we have to do is to find methods for detecting, identifying and tracing their origin. Three principal sources of information can be used to evaluate the mutagenic/carcinogenic health risk associated with chemicals (Figure 3);

- Epidemiological approach (human exposure data);
- Long term tests using various species of animals;
- Short term screening tests involving the use of microorganisms, insects and plants.

Figure 1 - Proposed relation between carcinogenicity and mutagenicity (3)



Epidemiological approach - This involves analysis of a large human population to look for a cause and effect relationship. One frequently used approach is to compare the rate of disease in an exposed group with the rate in an unexposed group and to evaluate the quantitative risk of exposure.

This approach has, however, proved to be inadequate for discovering the genotoxic risk of chemicals in the environment. As we know, there is a latency period of years to decades for cancer and one to many generations for a genetic effect.

Thus, before an epidemiological approach can reveal the information needed, situations have to exist where such long exposures to chemicals have occurred. In other words, the information may become available too late and by that time considerable harm is already done. Another problem with epidemiological studies is that they are very time consuming and expensive. Also, the methodology is fairly insensitive. For example, despite the massive amount of data showing the occurrence of animal mutagens and carcinogens in the environment there is virtually no epidemiological evidence of heritable defects in the human environment.

Long term tests in animals - This is an experimental approach and involves testing the chemical for mutagenic and carcinogenic effect in experimental organisms. Long term in vivo studies which involve intact animals tend to be very expensive and time consuming. Most experimental animals such as mice, rat or guinea pig have lifetime of several years; thus, if the study involves lifetime exposure, one has to wait for many years. For example, a conventional carcinogenic bioassay requires at least 3.5 years and \$250,000 per substance (Figure 4). Resources in terms of money and trained personnel are just not available to conduct long term studies on all new and existing chemicals.

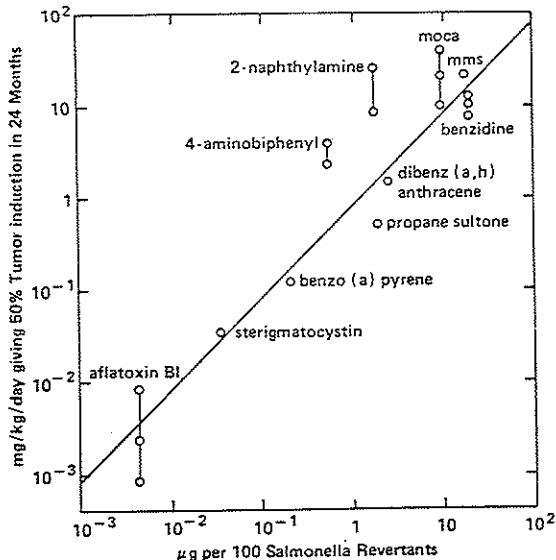
Short term screening tests - The high cost of long term animal studies has led to the development and application of faster and cheaper in vitro assays which involve experimental organisms such as bacteria, fungi, mammalian cell cultures, etc. These organisms have short generation times ranging from a half hour to a few days; thus one can study many generations, and experiment with a large population of organisms relatively inexpensively.

In vitro bioassays thus offer an excellent tool for the evaluation of the mutagenic/carcinogenic potential of chemicals as a substitute for the conventional long term bioassays and/or for establishing priorities for long term in vivo studies.

Table 1 - The range of mutagenic potency in the *Salmonella*/Microsome test (1)

	Revertants/ nmole	Ratio
1,2-Epoxybutane	0.006	1
Benzyl chloride	0.02	3
Methyl methanesulfonate	0.63	105
2-Naphthylamine	8.5	1,400
2-Acetylaminofluorene	108	18,000
Aflatoxin B ₁	7,057	1,200,000
Purylfuramide (AF-2)	20,800	3,500,000

Figure 2 - Relation between mutagenic and carcinogenic potency of ten compounds



In vitro test system

In vitro test systems have been developed to detect the mutagenic/carcinogenic effects of chemicals in bacteria, fungi and

Table 2 - The characteristics of the most common in vitro mutagenicity/carcinogenicity assays

Category	Organism and/or other cell types	System and/or strain	End points measured	Test duration
Bacteria				
Mutation	<i>Salmonella typhimurium</i>	Salmonella/microsome test his-tidine reversions	Point mutations; reversion by base-pair substitution or frame shift mutation.	< 3 wk
Mutation	<i>Salmonella typhimurium</i>	azaguanine-resistant	Gene mutations (forward mutations)	< 3 wk
Mutation	<i>Escherichia coli</i>	WP2 tryptophan reversions	Point mutations (base-pair substitutions)	< 3 wk
Mutation	<i>Escherichia coli</i>	K12 Strain 343/113 (Mohn strain)	Gene mutations (forward mutations and reversions at several loci)	< 3 wk
Repair test	<i>Escherichia coli</i>	polA ⁺ vs polA ⁻	Differential killing (via DNA damage)	< 3 wk
Repair test	<i>Bacillus subtilis</i>	rec ⁺ vs rec ⁻	Differential killing (via DNA damage)	< 3 wk
Fungi				
Mutation	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Reversion of auxotrophic mutations	Point mutations	< 3 wk
Mutation	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	White mutants in a red ad-7 strain	Gene mutations (forward mutations at five loci)	< 1 mo
Mutation	<i>Neurospora crassa</i>	ad-3 system; red adenine mutants	Gene (forward) mutations and small deletions in ad3A and ad3B	< 2 wk
Mutation	<i>Neurospora crassa</i>	Reversion of adenine auxotrophy in strains N23 and N24	Gene mutations	< 1 mo
Mutation	<i>Aspergillus nidulans</i>	Suppressors of meth-1	Gene (forward) mutations	< 1 mo
Mutation	<i>Aspergillus nidulans</i>	XDH conidal color system	Forward mutations and reversions	< 1 mo
Mitotic recombination	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Strain D1	Mitotic crossing-over	< 1 mo
Mitotic recombination	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Strain D3	Mitotic crossing-over	< 1 mo
Mitotic recombination	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Strain D4	Mitotic gene conversion	< 3 wk
Mitotic recombination	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Strain D5	Mitotic crossing-over	< 1 mo
Mitotic recombination	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Strain D7	Mitotic crossing-over and gene conversion	< 1 mo
Aneuploidy	<i>Neurospora crassa</i>	Multiply marked linkage group I	Meiotic nondisjunction	< 1 mo
Aneuploidy	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Strain D6	Mitotic aneuploidy	< 1 mo
Aneuploidy	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Strain D9	Meiotic nondisjunction	< 1 mo
Mammalian cells				
Mutation	Mouse lymphoma L5178Y cells	Thymidine kinase (TK) system	Gene (forward) mutations	< 2 mo
Mutation	Chinese hamster V79 lung cells	HGPRT system	Gene (forward) mutations	< 2 mo
Mutation	Chinese hamster ovary (CHO) cells	HGPRT system	Gene (forward) mutations	< 2 mo
Mutation	Human fibroblasts	HGPRT system	Gene (forward) mutations	< 2 mo
Cytogenetic damage	CHO or other cell types	In vitro cytogenetic analysis	Chromosomal aberrations	< 3 mo
Cytogenetic damage	Human lymphocytes or fibroblasts and other cell types	In vitro cytogenetic analysis	Sister chromatid exchanges	< 2 mo
DNA repair	Human fibroblasts, rat hepatocytes, or other cell types	Unscheduled DNA Synthesis	Repair of DNA damage, detected by (³ H)Tdr incorporation in DNA	< 3 mo
Transformation	Syrian Hamster	Embryo cells	Transformed foci	10-12 wk
Transformation	Mouse embryo	Balb/C-3T3	Growth in soft agar	8-12 wk
Transformation	Baby Hamster Kidney cells	BHK-21 Cl 13	Growth in soft agar	14-21 days

mammalian cell cultures. While plants and insects have also been used in short term tests, they are not of direct interest to microbiologists and therefore are not covered here. Table 2 provides an overview of the major test systems. Although many test systems are listed, relatively few of them are being used extensively in many laboratories. Widely used tests include: *Salmonella*/mammalian microsome test; repair deficient *E. coli*; gene mutations in cultured Chinese hamster or mouse lymphoma cells; chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, unscheduled DNA synthesis and transformation in mammalian cell cultures. In general, *in vitro* assays rely on one of the four types of biological activity: DNA damage and repair, gene mutations, chromosome aberrations and oncogenic transformation.

Compared to animals and humans, the microorganisms and isolated animal cells used in short term tests have only a limited capacity for activating chemicals. For this reason, the carcinogens/mutagens that are not directly active can not be detected in short term tests unless an exogenous metabolic activation system has been included in the assay. The available metabolic activation systems are shown in Figure 5. Of these, *in vitro* activation is most commonly used of its simplicity and effectiveness.

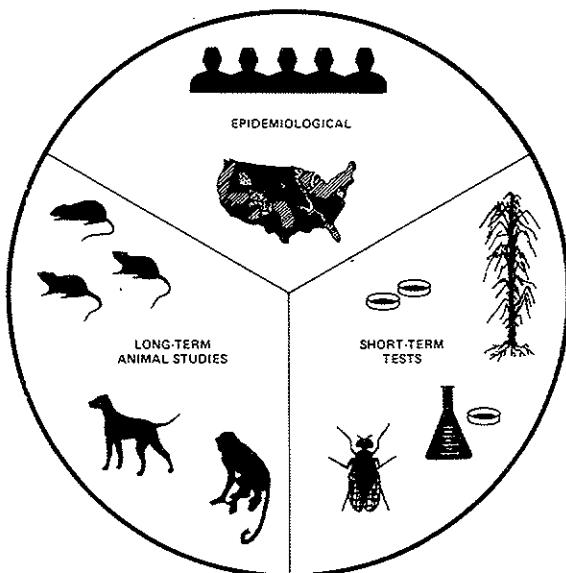
Bacterial mutagenicity assays - The Ames *Salmonella* assay is the most widely known of the bacterial test systems. The main reasons for this are: its simplicity, low cost, and fact that there is a large data base available on its performance. The assay is a reverse mutation assay and utilizes specially constructed strains of *Salmonella typhimurium* (1).

These strains are unable to grow on substrates lacking histidine unless a further mutation restores the histidine synthesis. The frequency of this reverse mutation is readily measured by counting the colonies that appear in an appropriate medium that lacks histidine. The test includes some tester strains that revert by base pair substitutions and other that revert by frameshift mutations (Table 3). Aside from the histidine mutations, numerous other properties have been built into the strains by mutations to increase their sensitivity. The strains are defective in DNA excision repair (*uvrB*) which prevents them from repairing the DNA damage caused by chemicals.

The strains also possess a mutation (*rfa*) that removes part of the lipopolysaccharide barrier of the cell wall and thereby makes the cell more permeable to chemicals. *Salmonella* strains TA 98 and TA 100 contain a R-factor plasmid pk101, which increases sensitivity of these strains probably by increasing the activity of an errorprone DNA repair system.

In the standard plate incorporation assay, the test substance, microbial cells and exogenous metabolic activation system (if needed) are mixed in soft agar and overlaid into a selective medium in a petri dish. Revertant colonies are counted after 48 hours of incubation. Metabolic activation in the assay is provided by a cofactor supplemented postmitochondrial system from the livers of rodents treated with enzyme inducing agents (e.g., polychlorinated biphenyl). This preparation is usually referred to as S-9.

Figure 3 - Main sources of information for mutagenic/carcinogenic potential of chemicals (Source: Short term tests for carcinogens, mutagens and other genotoxic agents, EPA - 625/9-79-003)



Specially constructed strains of *E. coli* have also been used in reverse mutation assays. *E. coli* WP-2 and its derivatives possess a base-pair substitution in a tryptophan gene (5). Reversion to tryptophan independence can be caused by base substitution mutagens. DNA repair mutation and the pK101 plasmid have been introduced into WP-2 stains to increase sensitivity.

Many bacterial genotoxicity assays are currently in use which measure and compare chemically induced killing between a wild type strain with full repair capacity and a mutant strain deficient in one or more enzyme(s) which govern repair of damaged DNA. The response is expressed as preferential inhibition of growth or killing of the repair-deficient strain since it is incapable of repairing the damage caused by a chemical. These assays do not measure mutagenic events per se but they are used as an indication of the interaction of a chemical with genetic material implying the potential for genotoxicity. The test can be used with the exogenous mammalian activation system (S-9).

Two widely used DNA repair system are as follows:

- a. *E. coli*: Strain W3110 (pol A+) parental strain which is normal for DNA polymerase I enzyme, and Strain P3078 (pol A-) which is deficient in DNA polymerase I enzyme;
- b. *B. subtilis*: Strain H17 (rec+) wild type, and Stain M45 (rec-) repair-deficient.

Fungal mutagenicity assays - The main reason for using fungi for screening mutagens is that mutagens that can not be detected in bacterial systems might be revealed with fungal systems. Being eukaryotes, fungi possess many genetic properties which are not present in bacteria. In addition, unrelated microorganisms apparently differ in susceptibility to the induction of mutation by various agents. Unfortunately, fungal test systems are less sensitive than bacterial test systems and therefore a higher dose of the test agent often are required. Also, mutagens requiring activation are not satisfactorily detected in fungal bioassays even with the addition of the exogenous metabolic activation system. The most commonly used fungal strains for mutagenicity screening are:

- a. Yeast: *Saccharomyces cerevisiae*;
- Schizosaccharomyces pombe*;
- b. Mold: *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*.

Table 3 - *Salmonella typhimurium* strains in routine use

Strain designation	Gene affected	Additional Repair	Mutations LPS	R factor	Mutation type detected
TA-1535	his G	uvrB	rfa	—	Base-pair substitution
TA-1537	his G	uvrB	rfa	—	Frameshift
TA-1538	his D	uvrB	rfa	—	Frameshift
TA-98	his D	uvrB	rfa	pKM 101	Frameshift
TA-100	his G	uvrB	rfa	pKM 101	Base-pair substitution

Figure 4 - Comparison of short term test and long term tests for carcinogens, mutagens and other genotoxic agents (Source: short term test for carcinogens, mutagens and other genotoxic agents, EPA-625/9-79-003)

COSTS		TIME OF PERFORMANCE	
Short-Term	Long-Term	Short-Term	Long-Term
\$200-\$20,000 Per Test	\$20,000-\$300,000 Per Test	4 Days to 26 Weeks	26 Weeks to 3 Years

Among these organisms, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is particularly suitable for genotoxicity assays because of its ability to exist in either a stable haploid phase or a stable diploid phase, its rapid growth and the ease with which single cell suspensions can be prepared. Techniques and strains have been described to detect mitotic cross-over, mitotic gene conversion, forward mutation and reverse mutations in *Saccharomyces cerevisiae*.

Forward mutations can be detected on the basis that mutations in any of the ade1 and ade2 loci will result in the accumulation of a red pigment and in the formation of easily detected red colonies on a medium with reduced adenine. Strain S211, a haploid methionine auxotroph, in the strain of choice in reverse mutagenesis.

Mitotic recombination (reciprocal crossing-over) between ade2

alleles which results in red/pink sectors in the colonies, and nonreciprocal mitotic gene conversion involving the alleles try5-12 and try5-27 can both be detected in the diploid yeast strain D7.

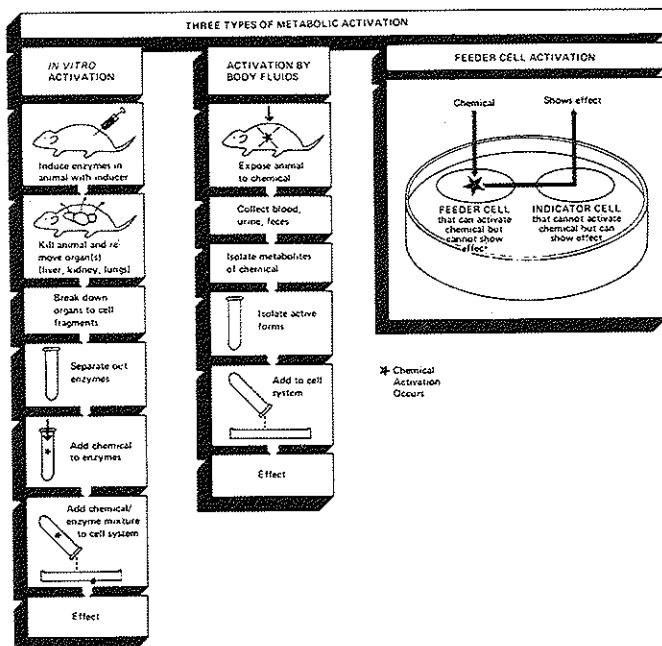
Mammalian cell culture tests - Mutagenesis/carcinogenesis testing in mammalian cell cultures generally rely on one of the four events: gene mutation from the parent type to the mutant condition, unscheduled DNA synthesis, chromosomal aberrations and oncogenic transformation.

The most commonly used target cells in cell mutagenesis assays are from clones of Chinese hamster lung V79 and Chinese hamster ovary (CHO) cell lines, and mouse lymphoma L5178 cells. These cells are suitable for mutagenesis studies because they have high plating efficiency (more than 50%), a short generation time (16 ± 4 hours), and in the case of Chinese hamster cells, a nearly diploid karyotype. Forward mutations are measured in these cell lines at the following loci:

- a. Thymidine kinase (TK) in mouse lymphoma L5178 cells;
- b. Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) in Chinese hamster ovary and Chinese hamster V79 cells.

Wild type mouse lymphoma and Chinese hamster cells contain respectively TK and HGPRT activity which enable them to convert certain mutagenic purine and pyrimidine analogues to toxic metabolites leading to cell death. Exposure of these cells to certain results in a mutation which causes loss of TK and HGPRT activity. The mutant cells thus produced are incapable of catalyzing this detrimental metabolism and hence, escape the lethal effect of the analogues. The assay can be coupled with exogenous mammalian metabolic activation systems. Examples of metabolic activation systems for the forward mutation assays include cofactor supplemented postmitochondrial fractions prepared from the liver of mammals treated with enzyme inducers, and primary cultures of mammalian hepatocytes.

Figure 5 - Generally used method of metabolic activation in mutagenicity bioassays (Source: short term tests for carcinogens, mutagens and other genotoxic agents, EPA-625/7-79-003)



Interaction of chemicals with DNA usually stimulates a repair response in which the altered portion of DNA is excised and the missing region is replaced by DNA synthesis. The synthesis of DNA in nondividing cells is known as unscheduled DNA synthesis and serves as a basis for assessment of genotoxicity in some *in vitro* bioassays. The repair of carcinogen/mutagen induced DNA damage is observed by the incorporation of precursors into DNA. The precursor usually is (³H) thymidine because it is specific for DNA. As base incorporation is much greater in semiconservative replication which occur during cell division, than in repair synthesis, the test is performed in the presence of hydroxyurea, an inhibitor of semiconservative replication (16). As test organism, primary cultures (cells which have not undergone any passage) of rat hepatocytes, or established cell lines (e.g., human diploid fibroblasts WI38) have been commonly used. A metabolic activation system is not needed with hepatocyte cultures. The most commonly used activation system for the WI38 assay is cofactor supplemented postmitochondrial fraction prepared from the livers of mammals treated with enzyme inducers. Uptake of labelled thymidine may be determined by autoradiography or by liquid scintillation counting of DNA from treated cells.

In vitro cytogenetic assays involves direct observation of chromosomal and chromatid aberrations and may employ cultures of established cell lines (e.g., L5178Y mouse lymphoma cells) or primary cell cultures. Following exposure of cell cultures to test substances in the presence and absence of metabolic activation, they are treated with drugs such as Colchicine or Colcemid® to arrest cells in a metaphase-like stage of mitosis (c-metaphase). Chromosome preparations from cells are made, stained and examined for chromosomal aberrations (5). Aberrations may be either structural or numerical. Structural aberrations may be chromosome type which result from damage expressed in both sister chromatids at the same locus or chromatid type resulting from damage expressed as breakage of single chromatid or breakage and/or reunion between chromatids. A simpler quicker and less expensive cytogenetic test uses sister chromatid exchange (SCE). The SCE assay detects the ability of a chemical to enhance the exchange of DNA between two sister chromatids of a duplicating chromosome. The test may be performed *in vitro* using Chinese hamster cell or primary cell cultures such as human lymphocytes, or *in vivo* using mice, rats or hamsters (9).

Commonly used metabolic activation systems for this assay include cofactor supplemented postmitochondrial liver preparation (S-9) or primary cell cultures of mammalian hepatocyte.

Relevance of *in vitro* test data to human health effects

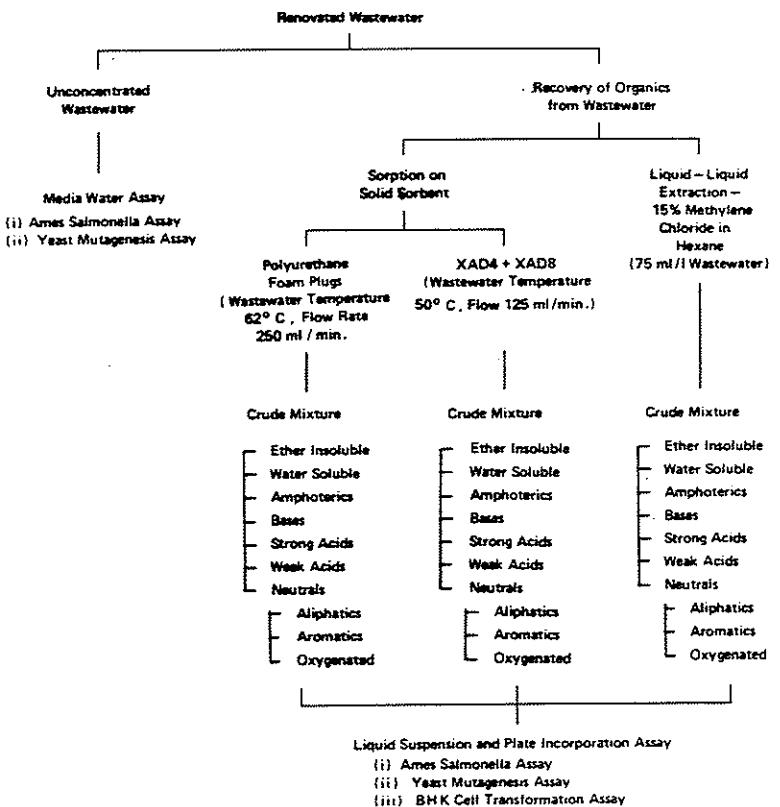
At the present time, there are recognized difficulties in interpreting *in vitro* mutagenicity/carcinogenicity test results in terms of human health hazards. This has placed limitations on the utilization of *in vitro* bioassays in hazard assessment of chemicals. It should be recognized, however, that with respect to mutagenic chemicals there is a general agreement that exposure at any level should

Table 4 - NAS recommended mutagens test program

A. Recommended tests		Tier II
1. <i>Salmonella</i> /microsome gene mutation		4. <i>Drosophila</i> X-linked lethal mutation
2. Mammalian cell gene mutation		
a. Alteration in hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase		
b. Alteration in Thymidine Kinase (TK)		
3. Mammalian cell chromosomal breakage		
B. Interpretation of data		
Outcome of the mutagenicity assays		Decision
Tier I		
Two or all three tests clearly positive		Presumed mammalian mutagen
One test positive, two tests negative		Move to Tier II
All three tests negative		Presumed mammalian nonmutagen
Tier II		
Tests result Positive		Presumed mammalian mutagen
Tests results Negative		Presumed mammalian nonmutagen

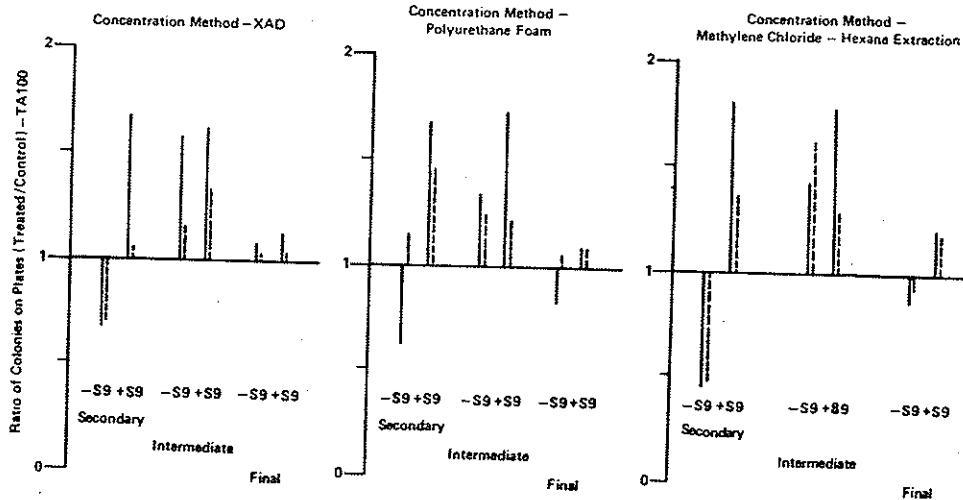
be avoided. Thus, even qualitative information, or data which provide only a rough idea of the potency, should be of value. Toxicological literature reveals several examples where short term tests have successfully predicted carcinogenicity of a number of important environmental chemicals with widespread human exposure. Examples include the flame retardant TRIS, the major industrial chemical 1,2-dichloroethane, and a series of hair dye chemicals.

Figure 6 - Overall protocol followed for mutagenicity/carcinogenicity testing of renovated wastewater



Generally an agent mutagenic in one species is also mutagenic in others. However, because of the differences in such characteristics as metabolism, excretion and DNA repair, the correlation is not perfect. Brusick (4) has estimated that 88% of animal carcinogens are bacterial mutagens and about that 85% of animal non-carcinogens have no mutagenic activity in bacteria. It is true that most *in vitro* bioassays fail to detect some known mutagens/carcinogens. For example, carcinogenic chemicals which operate through mechanisms other than genotoxicity, namely solid state carcinogens (e.g., asbestos), hormones (e.g., diethylstilbestrol), metal ions, and promoters (e.g., phorbol esters, phenols), can not be detected in the Ames *Salmonella* assay. Fortunately, these carcinogens constitute only a small number of the total. Furthermore, with continued efforts towards devising improved tester strains, more effective metabolic activation, modification of the assay conditions, and the use of a carefully chosen battery of short term tests, the number of false negatives and false-positives is expected to be reduced further.

Figure 7 - Mutagenic response of the organic mixtures recovered from secondary municipal effluent after partial and full advanced water treatment (AWT) at Piscataway in *Salmonella* strain TA 100.
 Symbols: Treated/control colonies ratio below 1.0 represents toxicity; — Concentrate volume equivalent to 20 ml wastewater; --- Concentrate volume equivalent to 50ml wastewater



U.S. National Academy of Sciences proposed mutagen test program

No single *in vitro* test is capable of detecting all types of effects that may be caused by genotoxic and carcinogenic chemicals. The problem has generally been overcome by using a group of tests which complement each other. Many testing strategies and test batteries have been proposed thus far, however, consensus does not exist on any one of these proposals. Recently the U.S. National Academy of Sciences (NAS) Committee on Chemical Environmental Mutagens studied this problem and recommended a test program (11). A unique feature of any recommendation made by the NAS is that they generally receive widespread acceptance among the scientific community and the public because of the prestigious nature of service of NAS Boards and Committees.

The NAS suggested test program uses two tiers of short term tests. Tier I consists of *Salmonella* reversion assay, a mammalian cell-culture gene mutation test, and a mammalian cell chromosomal breakage test. All tests should be conducted with and without metabolic activation. Tier II consists of the *Drosophila* X-linked lethal test. Details of the recommended testing scheme and the decision functions are shown in Table 4.

Identification of active ingredients in complex mixtures

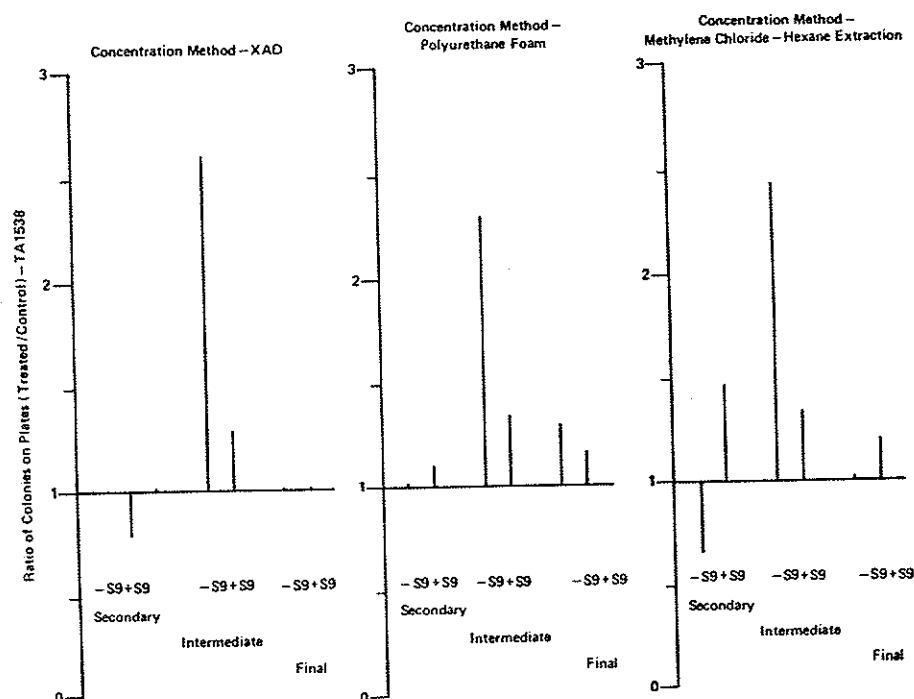
Conventional approaches for analyzing environmental samples have been (a) to chemically analyze the groups of compounds or individual compounds known to be genotoxic and (b) to completely chemically characterize the sample. The problem with complete chemical characterization is that it is very expensive. Furthermore, it does not reveal which if any, of the identified compounds are genotoxic. The problem in first approach which is to chemically analyzed for compounds which are known mutagens is that new mutagens will remain undetected.

An alternative strategy which is receiving increasing attention in recent days is to detect presumptive mutagenic activity by means of simple and rapid mutagenic

screening of mixed environmental samples, fractionation of mutagenic sample(s) into various chemical fractions and identification of biologically active fractions, and then physiochemical analysis of the active fraction to fix molecular composition. This strategy would eliminate the need for analysis of samples which do not contain active ingredients, and would detect unknown mutagens. Such an integrated bioassay and analytical approach would involve extensive evaluation of mixtures of varying degree of complexity. Various problems associated with the detection of mutagens in complex mixture are discussed below.

Figure 8 - Mutagenic response of the organic mixtures recovered from secondary effluent, and effluent after partial and full AWT at Piscataway in *Salmonella* strain TA1538.

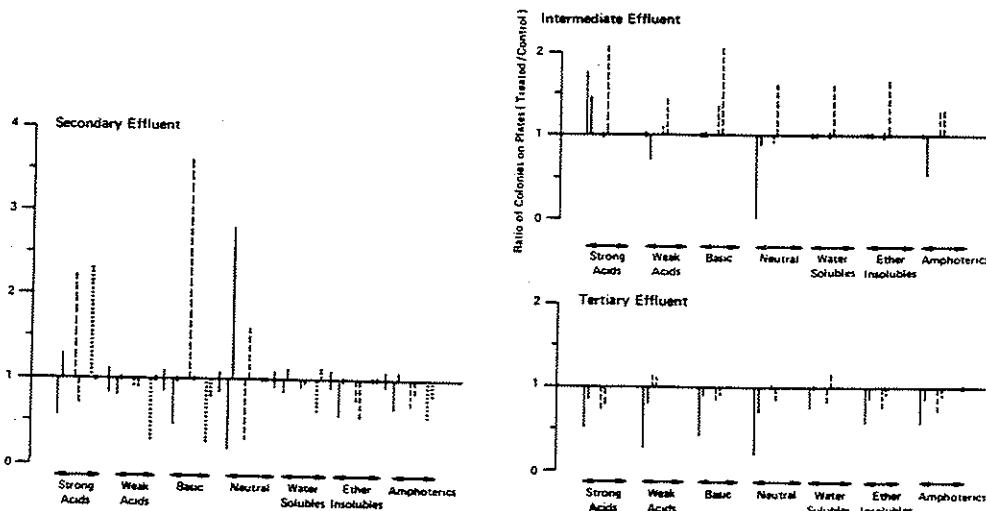
Symbols: Treated/control colonies ratio below 1.0 represents toxicity; The data shown is for concentrate equivalent to 50ml wastewater



Chemicals in complex mixtures may not act additively in their mutagenicity, rather there may be synergism or antagonism between mutagens. Sometimes complications may arise due to interaction between mutagens and nonmutagens. These factors contribute to ambiguities in the test results. For example, if a mixture is non-mutagenic, what is the assurance that it does not contain masked mutagens and carcinogens? An assay system chosen for detecting mutagens/carcinogens in complex mixtures should not only be able to detect mutagens and carcinogens with high degree of accuracy but should be able to do so in the presence of other materials present in complex mixtures. While the efficacy, sensitivity and reliability of many *in vitro* systems for detecting mutagens/carcinogens in pure form is fairly well defined, it is not known if these assay systems will respond in the same manner when active compounds are present in complex mixtures.

Figure 9 - Mutagenic activity of the major classes of compounds recovered from Piscataway wastewaters with polyurethane foam plugs as sorbent.

Symbols: The response shown is for each fraction volume representing 100ml wastewater; The first vertical line with each strain represents mutagenic activity in the absence of mammalian activation, the second vertical line is in the presence; — *Salmonella* Strain TA98; --- *Salmonella* Strain TA100; ... *Salmonella* Strain TA1535



Various factors relating to the complexity of the mixture and/or inherent problems with the bioassay which affect detectability of mutagenic/carcinogenic compounds in complex mixtures are listed below:

- The maximum dose or concentration that can be applied in assay system. The presence of non-mutagenic toxic components in complex mixture may limit the mutagen dose can be used in the assay. Some assay system may be able to detoxify or eliminate toxicants and this might impact on the limit of bioassay resolution and detectability;
- The number and sites of critical targets in the test organisms that must be affected to produce mutagenic response. The greater the number, the greater will be the possibility that something in the complex mixture might interfere with one or more of the sites;
- chemical interaction (synergistic or antagonistic) in complex mixture.

Numerous examples of interference in mutagenicity assays caused by components of complex mixtures have been reported in the literature. Glutathione, a naturally occurring tripeptide, has been shown to modify the response of many mutagens in the Ames *Salmonella* assay (12, 13). Histidine may be present in biological samples such as urine, municipal wastewater, blood, etc., and may interfere in the Ames *Salmonella* assay by artificially increasing the number of spontaneous revertants. The polycyclic aromatic fraction from tar sands was found to suppress the mutagenicity of 2-aminoanthracene in the Ames *Salmonella* assay, an example of antagonism between mutagens (15).

Detection of mutagens in water/wastewater – research findings

An investigation was undertaken in our laboratory to examine the presence of mutagenic/carcinogenic chemicals in wastewater and to evaluate the performance of available advanced wastewater treatment (AWT) methods to remove these chemicals.

Efforts in this study were also directed towards identifying active fractions and/or compounds in the wastewater. A five million gallon per day Model AWT plant located in Piscataway, Maryland, USA, was selected for this study. the AWT plant utilizes physical-chemical treatment which consists of lime addition, recarbonation (liquid carbon dioxide), dual media filtration, breakpoint chlorination, activated carbon filtration, and chlorination for disinfection. The flow received at this treatment facility represents some industrial wastewater. Three sampling locations representing various stages of treatment were selected for testing:

Sample № 1 - Secondary effluent which serves as influent for the AWT process. This sample is referred in the text as AWT influent

(liquid carbon dioxide), dual media filtration, breakpoint

Sample № 2 - Effluent after liming and recarbonation process. Referred in the text as intermediate effluent.

Sample № 3 - Effluent after lime addition, recarbonation, dual media filtration, breakpoint chlorination and activated carbon filtration, but before chlorine addition for disinfection. This sample is referred in the text as tertiary effluent. Samples could not be taken after the chlorination process because effluent from carbon columns flows into a polishing pond where receiving chlorination.

In an effort to recover a wide variety of organic contaminants present in wastewaters, three independent methods were utilized to recover organics. These included (i) sorption on polyurethane foam plugs, (ii) sorption on macroreticular resin and (iii) solvent extraction employing 15% methylene chloride in hexane. In studies with polyurethane foam plugs, the optimum conditions for recovery included a wastewater temperature of $62^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and a flow rate of $250 \pm 10\text{ml/min}$ (2). The best results with XAD resin were obtained when XAD-4 and XAD-8 were used maintaining wastewater temperature of 50°C and a flow rate of 100ml/min .

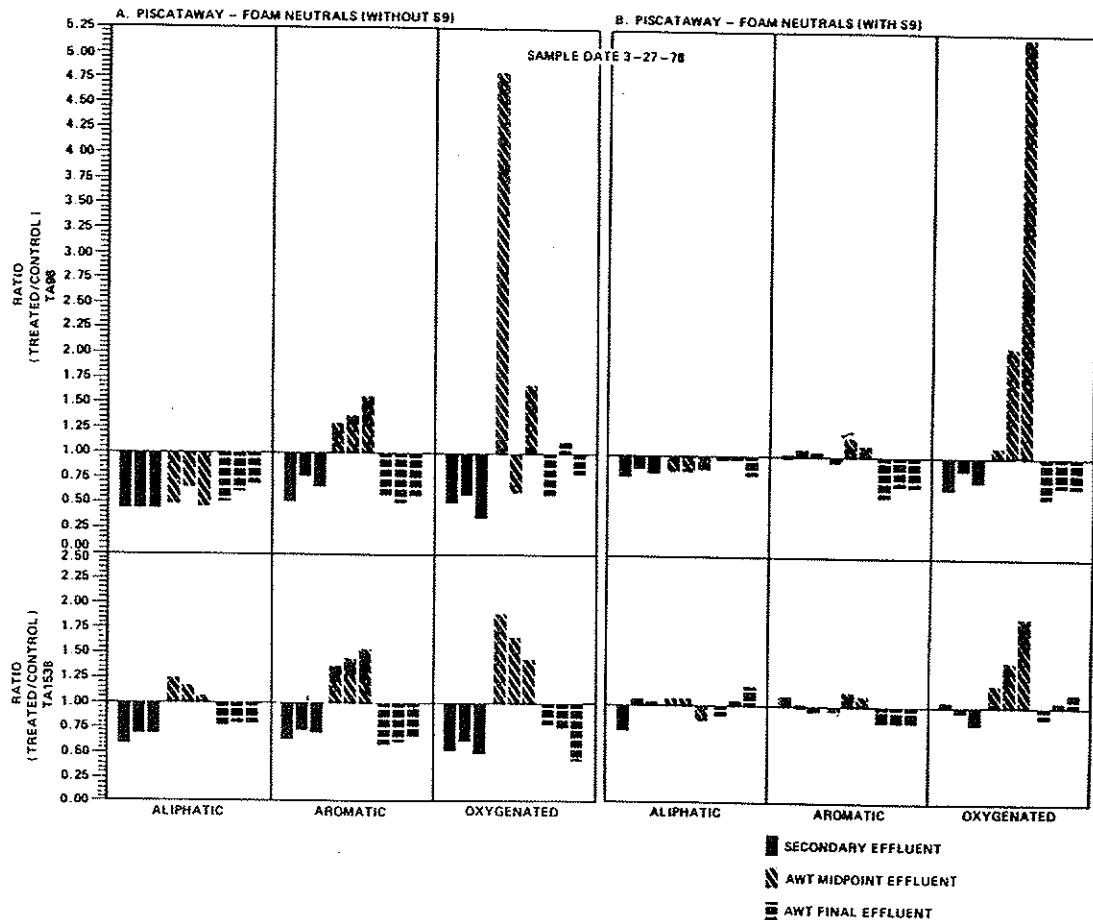
The crude mixtures recovered from wastewater were separated into major classes of organic compounds according to their solubility under acid, base, and neutral conditions using a modified Shriner-Fusion separation technique. Adsorption chromatography on a Silica gel column was used to subfractionate the neutral fraction into aliphatic, aromatic and oxygenated fractions.

The crude concentrates and their separated fractions were tested for mutagenicity/carcinogenicity using in vitro bioassays. In the absence of any data regarding performance of various available assay methods for wastewater, it was considered safer to use a battery of assay systems. The three assay systems chosen for the study were: Ames *Salmonella* assay, *Saccharomyces cerevisiae* assay (forward and reverse mutagenesis, somatic recombination and gene conversion), and cell transformation assay with BHK21 Cl13 cells. In preliminary studies, the cell transformation assay proved to be unsuitable as a routine assay because of an excessive time requirement and its erratic behavior. It was only used in selective instances to confirm the results obtained with the other assay. The overall protocol for recovery of organics, fractionation of crude concentrates and mutagenicity/carcinogenicity testing is shown in Figure 6.

Mutagenic responses in *Salmonella* strain TA100 and TA1538 of the recovered organics from wastewater samples after partial and full treatment are shown in Figure 7. Significant mutagenesis was not observed in strains TA1535, TA98 and TA1535. Although polyurethane foam collected the least amount of organic carbon, the recovered carbon possessed mutagenic activity roughly equivalent to that recovered with XAD and solvent suggesting some specificity of foam plugs for recovering mutagens. While AWT influent was not mutagenic to TA1538, it became mutagenic after partial treatment (liming and recarbonation). These findings show that liming and/or recarbonation processes may introduce compounds capable of causing frameshift mutations in *Salmonella*. The final AWT effluent did not exhibit significant mutagenic activity in any of the strains tested.

Figure 10 - Mutagenic activity of the components of neutral fraction of Piscataway wastewater collected with polyurethane foam as sorbent.

Symbols: Three vertical lines in each set represent 3 different concentrations of the fraction tested; Concentrations from left to right are: aliphatic and aromatic fractions, 200, 100 and 50ml wastewater; oxygenated representing 50, 25 and 10ml wastewater



Crude organic concentrates from these samples failed to induce reverse mutagenesis, mitotic recombination, or mitotic gene conversion in yeast. In the forward mutagenesis assay with *Saccharomyces* Strain S288C, the wastewaters caused a small increase in the number of canavanine sulfate resistant colonies. The mutagenic response followed the general trends observed with the Ames assay, i.e., if the intermediate effluent was weakly mutagenic, but the influent and tertiary effluent were non-mutagenic. The results with yeast were indicative of the low sensitivity of the assay. In the cell transformation assay, AWT influent and partially treated effluent gave positive results, i.e., increased numbers of colonies in soft agar. The organics recovered from the tertiary effluent elicited at best only a marginal increase in the number of transformed colonies.

The crude organic concentrates of wastewaters were chemically fractionated and each fraction evaluated for mutagenic/carcinogenic activity with the objective (a) to uncover the activity which may have been masked because of the complexity of crude concentrates, and (b) to identify the chemical class(es) responsible for the activity. In terms of quantities and classes of mutagenic substances recovered by

the concentration procedures employed, the performance of polyurethane foam plugs was better than that of XAD and solvent extraction. Therefore, the focus in these studies was on the fractionation and testing of organics recovered by polyurethane foam plugs. The combined activity of all of the separated fractions was generally higher than that of the crude concentrates, indicating the presence of masking agents in the crude mixtures.

The mutagenic activity recovered by foam plugs from AWT influent was distributed largely in the basic, strong acid and neutral fractions (Figure 9). The response was noted in strain TA100 and TA98 without the presence of the mammalian activation system. Liming and recarbonation steps resulted in an increase in the number of fractions which were mutagenic. For example, ether insoluble, amphoteric and weak acid fractions of the influent were nonmutagenic, but became weakly to moderately mutagenic after liming and recarbonation (intermediate effluent). The separated fractions from the tertiary effluent were nonmutagenic but exhibited strong toxicity to *Salmonella*. It is probable that the mutagenic response of the separated fractions of tertiary effluent may have been obscured by toxicity. The neutral fractions of various concentrates were subfractionated into aliphatic, aromatic and oxygenated fractions for further characterization of the mutagenic component. These studies revealed a strong mutagenic response in the oxygenated fraction of the partially treated wastewater (Figure 10). The AWT influent and effluent samples were toxic to *Salmonella* but did not show a mutagenic response. The data suggest that the mutagens introduced during liming and recarbonation steps belong to the oxygenated neutral class.

The possible mechanisms for increase in mutagenesis of wastewaters after liming/recarbonation are:

- a. mutagens may have been synthesized under alkaline conditions of liming or during recarbonation from precursors present in wastewaters;
- b. mutagenic compounds may have been added to the wastewaters as contaminants of the chemical additives used in the liming/recarbonation steps;
- c. the liming and recarbonation process may be responsible for removing some masking agents or toxicants which could have prevented expression of activity in the influent. With the data available, none of these possibilities can be verified.

Further physiochemical analysis of this fraction is necessary in order to identify specific compound(s) responsible for the activity. These studies also suggested that the treatment processes employed at the Model AWT plant here are able to adequately remove mutagenic chemicals present in the wastewater and those introduced during treatment steps.

References

1. Ames, B.N. & col. - Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian: microsome mutagenicity test. In: - Kilbey, B.J., eds. - Handbook of mutagenicity test procedures. London, Elsevier Scientific Publishing, p.1-18, 1977.
2. Basu, D.K. & Saxena, J. - Monitoring of polynuclear aromatic hydrocarbons in water. II - Extraction and recovery of six representative compounds with polyurethane foams. Environ. Sci. Technol., 12:791, 1978.
3. Brusick, D.J. - The rationale for conducting mutagenesis testing. Chemical Times and Trends, p.29-23, 1978.
4. Brusick, D.J. - Principles of genetic toxicology. New York, Plenum Press, p.279, 1980.
5. Green, M.H.L. & Muriel, W.J. - Mutagen testing using reversion in *Escherichia coli*. Mutation Res., 38:3-32, 1976.
6. EPA/US - Health effects test guidelines, EPA 560/6-82-100. Washington, D.C., National Technical Information Service, U.S. Department of Commerce, 1982.
7. Hollstein, M. & col. - Short-term tests for carcinogens and mutagens. Mutation Res., 65:133-226, 1979.

8. Iliff, M. & col. - Organic chemicals in the environmental. *New Science*, 52:263-265, 1972.
9. Latt, S.A. & col. - Sister chromatid exchanges: a report of the U.S. EPA's Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 87:17-62, 1981.
10. Martin, D. - *Wall Street Journal*, 191:48, May 9, 1978.
11. National Academy of Sciences - Identifying and estimating genetic impact of chemicals mutagens. Washington, D.C., NAS Press, p.217-244, 1982.
12. Nemato, N. & col. - Modification of the mutagenicity of benzo(a)pyrene on bacteria by substrates of enzyme producting water soluble conjugates. *Toxicol. Letters*, 2:205, 1978.
13. Runnug, U. & col. - The mutagenic effect of 1,2-dichloroethane on *S. typhimurium*. I - Activation through conjugation with glutathione "in vitro". *Chemical Biol. Interactins*, 20:1, 1978.
14. Saxena, J. & col. - Occurrence of mutagens/carcinogens in municipal wastewater treatment. *Proceedings Water Reuse Symposium*, Washington, D.C., March 25-30, 1979. Denver, Colorado, American Water Works Association, 1979.
15. Shahin, M.M. & Fournier, F. - Suppression of mutation induction and failure to detect mutagenic activity with athabasca tar sand fractions. *Mutation Res.*, 58:29, 1978.
16. Stich, H.F. & col. - Unscheduled DNA synthesis of human cells as a short term assay for carcinogens. In: - Hiatt, H.H., ed. - *Origins of human cancer*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, Book B, p.1499-1512, 1977.
17. Zimmermann, F.K. - Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: - Kilbey, B.J., ed. - *Handbook of mutagenicity test procedures*. London, Elsevier Scientific Publishing, 1977.

SOBREVIVÊNCIA DE SALMONELLA EM CARNE BOVINA MOÍDA ARMAZENADA EM BAIXAS TEMPERATURAS*

Maria do Socorro Lira Coelho
 Walter Vieira Guimarães
 Arnaldo Chaer Borges
 Daison Olzany Silva
 & Elza Fernandes de Araújo

Deptº de Biologia Geral
 Universidade Federal de Viçosa
 36570 Viçosa MG, Brasil

Resumo

Amostras de carne bovina moída, de cinco açougues da cidade de Viçosa, MG, foram armazenadas a 4°C por 14 dias, a 0°C e -18°C por 90 dias, para análise das populações de bactérias não fermentadoras de lactose (Lac⁻) e determinação da sobrevivência e da resistência de *Salmonella* a drogas antimicrobianas. As amostras, submetidas ao pré-enriquecimento em caldo lactosado, apresentaram-se com populações de bactérias Lac⁻ superiores às amostras sem o pré-enriquecimento. Foi observado aumento nas populações de células Lac⁻, nos primeiros dias de armazenamento a 4°C e a 0°C. Após 21 dias, houve redução do número de células Lac⁻, nas amostras conservadas a 0°C. Nas amostras a -18°C foi observada tendência de redução das populações de células Lac⁻, ao longo do período de armazenamento. Células de *Salmonella* foram isoladas de amostras em todos os tempos e temperatura. O nível de resistência, aos vários antibióticos, das células de *Salmonella*, foi baixo.

Summary

Survival of Salmonella in ground beef under low storage temperatures

Ground beef samples collected at five butchers in Viçosa, Minas Gerais, were stored for 14 days at 4°C and for 90 days at 0° and -18°C. Survival and antibiotic resistance of *Salmonella* were determined, as well as the presence of Lac⁻ (non-lactose-fermenting) bacteria. Samples submitted to a previous enrichment in lactose broth showed higher populations of Lac⁻ bacteria than those without enrichment. When samples were stored at 4°C and 0°C the population of Lac⁻ bacteria increased during the initial period of the treatment. However, after 21 days, a reduction in the size of this population was noticed in the samples stored at 0°C. At -18°C a tendency to reduction of the Lac⁻ bacteria was noticed throughout the experiment. *Salmonella* isolates were obtained periodically from samples of all treatments. The resistance level to several antibiotics of these isolates was considerably low.

* Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor.

Rev. Microbiol., São Paulo, 15(1):17-23, Jan./Mar. 1984.

Introdução

Nas pequenas cidades, o abate de animais, o transporte da carne, até os pontos de revenda e a comercialização, geralmente, são feitos em condições higiênicas precárias, aumentando o perigo de contaminação da carne, por bactérias patogênicas. A contaminação da carne, por *Salmonella*, constitui sério problema para a saúde pública, uma vez que estas bactérias causam infecções graves, ao homem e animais (3, 18).

A transmissão de *Salmonella* ocorre, principalmente, pela rota fecal-oral, uma vez que o reservatório primário dessas bactérias é o trato intestinal do homem e dos animais (18). Esses germes são frequentes em aves, suínos e bovinos (7, 15, 17, 20, 23).

Produtos perecíveis, de origem animal, podem ser conservados em baixas temperaturas. Segundo Ayres, as bactérias do gênero *Salmonella* não se multiplicam na superfície das carcaças naturalmente contaminadas e conservadas sob refrigeração (22).

Há inibição do crescimento microbiano, em carne moída, artificialmente contaminada com *Salmonella* e armazenada a 7°C, por 5 dias (11).

O congelamento de alimentos permite a sobrevivência de *Salmonella* por longos períodos (18, 21). Mossel & col. (12), afirmam que 5% das células sobreviventes perderam a viabilidade, mensalmente, quando a carne era mantida a -20°C.

O uso de antibióticos, no controle de agentes causais de doenças e na fabricação de rações de animais, tem contribuído para o aumento de bactérias resistentes a tais drogas (3). Estudos comparativos de níveis de resistência a drogas, em bactérias aeróbias, Gram negativas, isoladas nos EUU e no Brasil, revelaram que 19,7% das estirpes brasileiras apresentavam resistência média maior que as norte-americanas (25).

O fato foi atribuído ao maior uso de antibiótico ou à elevada incidência de doenças infecto-contagiosas no Brasil. A resistência a antibióticos, em *Salmonella*, tem sido associada à presença de plasmídios cuja transmissibilidade tem sido constatada em alguns casos (2, 13).

O presente trabalho teve como objetivos determinar a população de bactérias, não fermentadoras de lactose, a sobrevivência e a resistência de *Salmonella* a antibióticos, em amostras de carne bovina moída, armazenadas a 4°C, 0°C e -18°C, por vários períodos de tempo.

Material e Métodos

Amostras de 1,0kg de carne bovina moída foram adquiridas de cada um de cinco açougueiros, escolhidos ao acaso, entre os 25 existentes na cidade de Viçosa, MG. As amostras de carne foram misturadas, subdivididas em lotes de 300g e acondicionadas em sacos plásticos. Três lotes foram armazenados a 4°C e analisados após um, sete e quatorze dias; sete lotes, a 0°C e analisados após um, sete, 14, 21, 30, 60 e 90 dias e quatro lotes a -18°C, analisados após um, 60 e 90 dias.

Para as contagens das bactérias não fermentadoras de lactose (*Lac⁻*), utilizaram-se 25g de carne de cada lote, para homogeneização com 225ml de caldo lactosado, em liquidificador, por dois minutos. Para avaliação das populações *Lac⁻*, sem o pré-enriquecimento em caldo lactosado, aliquotas de 0,1ml de diluições decimais do homogenato, em triplicata, foram imediatamente espalhadas na superfície de ágar MacConkey e as placas incubadas a 35°C por 24 horas. Avaliaram-se, também, as populações *Lac⁻*, após o pré-enriquecimento em caldo lactosado, utilizando-se o restante do homogenato, depois do repouso por uma hora, adição de 2,2ml de Tween-80 e incubação a 35°C por 24 horas. Aliquotas de 0,1ml de diluições decimais do homogenato, em triplicata, foram, a seguir, espalhadas na superfície de ágar MacConkey e as placas incubadas a 35°C por 24 horas.

Considerou-se *Lac⁻* as colônias claras, nas placas com ágar MacConkey. Os resultados expressam as populações *Lac⁻*, com ou sem pré-enriquecimento, em caldo lactosado, em 25g de carne.

Para o isolamento de *Salmonella*, 1ml do homogenato pré-enriquecido foi transferido para 10ml de caldo selenito e para 10ml de caldo tetratrationato e os tubos incubava-

dos a 35°C por 24h. A partir dos tubos com crescimento, foram retiradas, por meio de alça de repicagem, pequenas porções de células e transferidas para a superfície dos meios ágar-verde brilhante-sulfadiazina (EGAS), ágar-sulfito de bismuto (BSA) e ágar *Salmonella-Shigella* (SSA). Após incubação a 35°C por 24 horas, quatro a cinco colônias típicas, de cada meio, foram transferidas para tubos contendo meio ágar-tríplice-açúcar-ferro (TSI) inclinado e incubados a 35°C por 24 horas. O criatório, utilizado para indicar a presença de *Salmonella*, foi o aparecimento de coloração vermelha, na parte superior do TSI e amarela, na parte inferior, com ou sem produção de H₂S (10).

A identificação do gênero foi baseada em testes bioquímicos e sorológicos, recomendados pelo FDA (10), partindo-se das culturas com comportamento típico de *Salmonella* no meio TSI.

Os testes sorológicos foram feitos, utilizando-se antissoros *Salmonella* H poli a-z e *Salmonella* O poli A-I e Vi (Difco), seguindo-se a técnica de soroaglutinação rápida (10).

O nível de resistência a canamicina (Km), estreptomicina (Sm), cloranfenicol (Cm), tetraciclina (Tc) e ácido nalidíxico (Nx) foi determinado para algumas das salmonelas isoladas, utilizando-se as concentrações de 1, 2, 5, 10, 20, 50 e 100µg/ml e o método de diluições recomendado por Chartone-Souza (5). O nível de resistência foi determinado considerando-se a maior concentração do antibiótico que possibilitou o crescimento das células.

A ocorrência de plasmídios naturais foi determinada pelo método de eletroforese em gel de agarose (14). A extração de plasmídios foi feita pela técnica recomendada pelo Dr. Diógenes S. Santos (com. pessoal).

Resultados e Discussão

Os resultados das determinações de populações de bactérias não fermentadores de lactose (Lac⁻), nas amostras de carne, armazenadas a 4°C, 0°C e -18°C estão indicados nas Figuras 1, 2 e 3.

As amostras de carne, submetidas ao pré-enriquecimento, em caldo lactosado, apresentaram populações maiores que as sem pré-enriquecimento, em todas as temperaturas de armazenamento (Figuras 1, 2 e 3). Os resultados mostram a importância de pré-enriquecimento, em caldo lactosado, para a recuperação de células, debilitadas, pela ação das baixas temperaturas de armazenamento. Recuperação de células, por pré-enriquecimento, tem sido observada por vários pesquisadores (8, 16).

Observou-se (Figura 1) a redução do número de células Lac⁻, nos primeiros dias de armazenamento, nas amostras sem pré-enriquecimento, possivelmente devido à incapacidade das células debilitadas crescerem, diretamente, nos meios seletivos, utilizados. Após o período de queda, inicial, as células sobreviventes foram capazes de se multiplicar e atingir populações maiores que as iniciais. Quando se utilizou o pré-enriquecimento, foi verificado aumento na população de bactérias Lac⁻, ao longo de todo o período de armazenamento. Estes resultados reforçam as informações de que o armazenamento de carne, a 4°C, por períodos prolongados, não é recomendável, uma vez que esta temperatura não impede o aumento da população bacteriana e provocará a deterioração do produto. As amostras, conservadas a 4°C, por 21 dias, já estavam deterioradas.

Nas amostras conservadas a 0°C (Figura 2), observou-se aumento de população, nas primeiras semanas e, depois, um decréscimo, atingindo, ao longo do período, valores inferiores às populações iniciais, tanto nas amostras com e sem pré-enriquecimento.

Notou-se redução do número de células viáveis, ao longo do período de armazenamento a -18°C, nas amostras sem o pré-enriquecimento (Figura 3). Quando se faz o pré-enriquecimento, ligeiro aumento de população foi observado, nas amostras conservadas por 30 dias. No entanto, a tendência geral foi a redução da população, mostrando o efeito das baixas temperaturas sobre a viabilidade dos microrganismos.

Os resultados da identificação das culturas, obtidas a partir de colônias típicas, em meios seletivos, estão indicados na Tabela 1. Do total de 792 culturas, apenas 262 (33%) foram caracterizadas como *Salmonella*, por testes bioquímicos e sorológicos.

Figura 1 - Populações de bactérias não fermentadoras de lactose ($Lac^-/25g$ de carne), em amostras de carne armazenada a 4°C por 14 dias. Símbolos: \circ = Lac^- sem pré-enriquecimento; \bullet = Lac^- com pré-enriquecimento

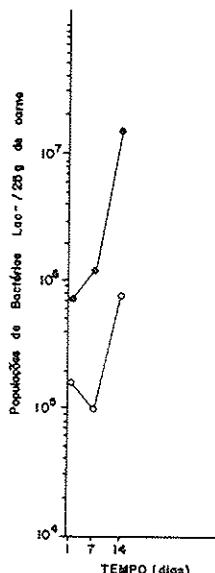


Figura 2 - Populações de bactérias não fermentadoras de lactose ($Lac^-/25g$ de carne), em amostras de carne armazenada a 0°C por 90 dias. Símbolos: \circ = Lac^- sem pré-enriquecimento; \bullet = Lac^- com pré-enriquecimento

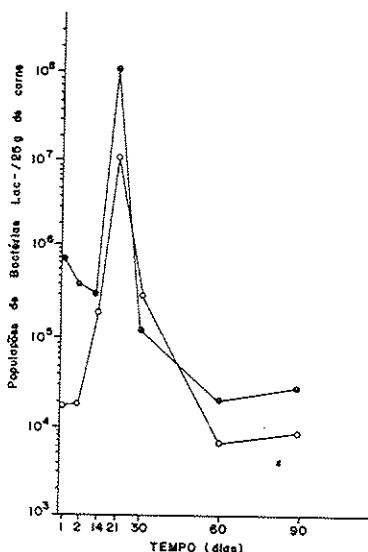
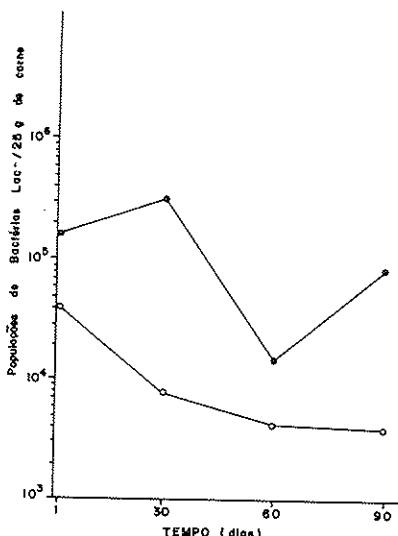


Figura 3 - Populações de bactérias não fermentadoras de lactose ($Lac^-/25g$ de carne), em amostras de carne armazenada a -18°C por 90 dias

Símbolos: \circ = Lac^- sem pré-enriquecimento; \bullet = Lac^- com pré-enriquecimento



Os resultados da identificação das culturas, obtidas a partir de colônias típicas, em meios seletivos, estão indicados na Tabela 1. Do total de 792 culturas, apenas 262 (33%) foram caracterizadas como *Salmonella*, por testes bioquímicos e sorológicos.

Os testes de produção da urease (Tabela 1) mostraram que apenas parte das culturas, isoladas a partir de colônias típicas, em meios seletivos, pertencia ao gênero *Salmonella*. Estas bactérias são urease-negativas (1, 9, 10). Os testes com antissoro poli H e poli O confirmaram como *Salmonella*, a maioria das culturas urease-negativas. Pode-se, assim, notar a necessidade de se associar as características morfológicas, das colônias nos meios seletivos, com os resultados dos testes bioquímicos e sorológicos, para a identificação de bactérias do gênero *Salmonella*.

A presença de *Salmonella* em amostras de carne, armazenadas a 0°C e -18°C , por 90 dias, indica que estas bactérias sobrevivem a períodos longos de armazenamento, sob baixas temperaturas. O método de conservação da carne bovina moída a baixas temperaturas não garante a eliminação de microrganismos, provenientes da contaminação accidental das carcaças. Já foi afirmado que o congelamento de alimentos permite a sobrevivência de *Salmonella*, por longos períodos (18, 21).

A Figura 4 mostra a distribuição de 50 culturas de *Salmonella*, quanto à resistência a antibióticos. A maior parte das culturas apresentou baixa resistência à estreptomicina (Sm), canamicina (Km), ácido nalidíxico (Nx) e tetraciclina (Tc) tendo havido crescimento em meio contendo antibiótico até à concentração de $2\mu\text{g/ml}$. Os resultados sugerem que as culturas analisadas não se originaram de organismos sujeitos à pressão de seleção, por antibióticos.

O resultado do teste de resistência ao cloranfenicol (Figura 4) mostra que a maior parte das culturas apresentou resistência a até $10\mu\text{g/ml}$. Estes resultados podem ser consequência do maior uso deste antibiótico, em animais.

Figura 4 - Distribuição dos níveis de resistência à antibióticos, em 50 culturas de *Salmonella*

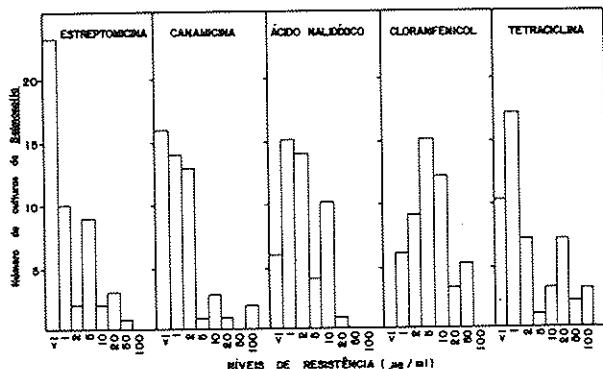


Tabela 1 - Identificação das culturas isoladas das amostras de carne armazenada a 4°C, 0°C e -18°C.

Símbolos: * = Porcentagem calculada em função do número de colônias com reações negativas no teste de ureia

Armazenamento (to) (dias)	Colônias típicas		Colônias de <i>Salmonella</i> confirmadas	
	Meios seletivos (Nº)	Ureia negativa (Nº)	(Nº)	(%)*
4°C	1	63	15	13 86,7
	7	58	23	20 86,9
	14	60	44	22 50,0
	1	70	18	2 11,1
	7	58	24	17 70,8
	14	59	29	27 93,1
0°C	30	63	30	18 60,0
	60	57	19	15 78,9
	90	52	39	28 71,8
	1	69	31	21 67,7
-18°C	30	63	16	16 100,0
	60	50	25	19 76,0
	90	70	57	44 77,2

Em presença da tetraciclina, a distribuição se assemelha à bimodal (Figura 4). Este tipo de distribuição foi atribuído à existência de duas populações distintas, uma sensível e outra resistente ao antibiótico (24). Assim, pode-se dizer que a maioria das culturas isoladas eram sensíveis à tetraciclina. Curha & col. (6) constataram sensibilidade a 1,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tetraciclina, em 85 amostras de *S. typhi*, analisados no período de 1930 a 1973.

A presença de plasmídios foi evidenciada em algumas das culturas de *Salmonella*. No entanto, sua relação, com resistência à drogas e transmissibilidade, não foi ainda determinada.

O uso generalizado de drogas antimicrobianas, visando o controle de agentes infeciosos, tem favorecido a seleção e predominância de estirpes resistentes às diversas drogas. Os trabalhos com *Salmonella* mostraram esta tendência e, muitas vezes, a resistência tem sido associada com a presença de plasmídios (2, 4, 13, 19). O controle de infecções, de origem bacteriana, pode ser dificultado, ainda mais quando estes plasmídios transferem as marcas de resistência a antibióticos, para outras células.

Os resultados demonstram a necessidade de se assegurar a melhoria nas condições sanitárias e higiênicas do local de abate dos animais e nas operações de armazenamento e comercialização do produto.

O ensinamento de princípios básicos de higiene, para aqueles que manipulam a carne, desde o abate até sua comercialização, seria a forma adequada de se reduzir a contaminação da carne, por *Salmonella*.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro (Proc. 40.0549/80 CNPq/PIG III).

Agradecemos também aos Profs. Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira, Sérvio Túlio Alves Cassini e José Mário da Silveira Mezêncio, pela colaboração e pelas críticas e sugestões.

Referências Bibliográficas

1. Association of Official Analytical Chemists - Official methods of analysis. 11.ed. Washington, D.C., 1970.
2. Bezanson, G.S.; Pauzé, M. & Lior, H. - Antibiotic resistance and R-plasmids in food chain *Salmonella*: evidence of plasmid relatedness. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41:585-592, 1981.
3. Bryan, F.L. - Emerging foodborne diseases. II - Factors that contribute to outbreaks and their control. *J. Milk Food Techn.*, 35:632-638, 1972.
4. Câmara, F.P. & Cardoso, M.A. - Epidemiologia da resistência plasmidial à drogas em salmonelas isoladas em esgotos da cidade do Rio de Janeiro. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 12:14-16, 1981.
5. Chartone-Souza, E. - Resistência a drogas e propriedade colicinogênica em *Escherichia coli*. Belo Horizonte, UFMG, 1975. (Tese de Mestrado).
6. Cunha, M.A.S.; Suassuna, I. & Suassuna, I.R. - Níveis de sensibilidade in vitro de *Salmonella typhi* isolada no Brasil no período de 1930 a 1973, a antimicrobiana de emprego clínico. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 11:113-116, 1980.
7. Cunha Netto, S.J.; Brand, P.C.; Ferreira, M.D. & Pessoa, G.V.A. - Sorotipos de *Salmonella* isoladas de carcaças de frangos de corte, em três abatedouros, em Belo Horizonte, MG, 1974. *Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG*, 28:125-129, 1976.
8. Edel, W. & Kampelmacher, E.H. - Comparative studies on the isolation of sublethally injured salmonellae in nine european laboratories. *Bulletin WHO*, 48:167-174, 1973.
9. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of *Enterobacteriaceae*. 3.ed. Minneapolis, Minnesota, Burgess Publishing, 1972.
10. Food and Drug Administration - Bacteriological analytical manual for food. 3.ed. Washington, D.C., Dept. of Health, Education and Welfare, 1972.
11. Goepfert, J.M. & Kim, H.U. - Behavior of selected food-borne pathogens in raw ground beef. *J. Milk Food Techn.*, 38:449-452, 1975.
12. Ingram, M. & Simonsen, B. - Meats and meat products. In: - Silliker, J.H., ed. - Microbial ecology of foods. New York, Academic Press, Vol.2, 1980.
13. Magalhães, M. & Véras, A. - Plasmídios R de cepas hospitalares de *Salmonella typhimurium*. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 10:43-45, 1979.
14. Meyers, J.A.; Sanchez, D.; Elwell, L.P. & Falkow, S. - Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 127:1529-1537, 1976.
15. Moreno, G.; Panetta, J.C. & Bottino, J.A. - Isolamento de enterobactérias a partir de produtos cárneos embutidos. *Arquivo do Instituto Biológico*, 36:191-196, 1969.
16. Mossel, D.A.A. & Ratto, M.A. - Rapid detection of sublethally impaired cells of *Enterobacteriaceae* in dried foods. *Appl. Microbiol.*, 20:273-275, 1970.
17. Oliveira, A.R. - Ocorrência e técnica de isolamento de *Salmonella* em carnes comercializadas em retalho na cidade de Belo Horizonte. Belo Horizonte, UFMG, 1981. (Tese de Mestrado).
18. Prost, E. & Riemann, H. - Food-borne salmonellosis. *Ann. Rev. Microbiol.*, 21:495-528, 1967.
19. Reis, M.H.L.; Ramos, M.J.C. & Trabulsi, L.R. - Resistance to mercury in enteric organisms: frequency and genetic nature. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 9:24-30, 1978.
20. Silliker, J.H. - Status of *Salmonella*: ten years later. *J. Food Protect.*, 43:307-313, 1980.
21. Sinskey, T.J.; Silverman, G.J. & Goldblith, S.A. - Influence of platen temperatures and relative humidity during storage on the survival of freeze-dried *Salmonella typhimurium*. *Appl. Microbiol.*, 15:22-30, 1967.
22. Smith, F.C.; Adams, J.C. & Field, R.A. - Predominant psychrotrophic bacteria on fresh and aged ground beef and antelope. *J. Milk Food Techn.*, 38:516-517, 1975.
23. Taylor, J. & McCoy, J.H. - *Salmonella* and *Arizona* infections. In: - Riemann, H., ed. - Food bore infections and intoxications. New York, Academic Press, 1969.

24. Trabulsi, L.R.; Zulliani, M.E. & Toledo, M.R.F. - Resistance to nine drugs of *Shigella* strains isolated in São Paulo between 1963 and 1968. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 1:71-77, 1970.
25. Ximenes, J.; Fry, W.; Hirai, C.K. & Mimica, I. - Comparação da resistência a drogas de organismos Gram negativos aeróbios isolados nos E.U.A. e no Brasil. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 10:97-99, 1979.

ADAPTAÇÃO DE MÉTODOS CLÁSSICOS DE ANÁLISE DE PENICILINAS À CEFAZOLINA*

Therezinha de Jesus Gomes Oliveira

Deptº de Antibióticos
Centro de Ciências Biológicas UFPE
Cidade Universitária
50000 Recife PE, Brasil

Resumo

O método iodométrico requer o emprego de solução tampão; o de peróxido de hidrogênio é satisfatório; o colorimétrico (hidroxilamina) dá bons resultados, com ou sem níquel^{II}, embora a absorção seja maior na presença de níquel.

Summary

Adaptation of classic methods for penicillins analysis to cephazoline

In iodometric method the use of buffer solution is indispensable; hydrogen peroxide is satisfactory; in colorimetry (hydroxylamine) results are good, both in the presence or absence of nickel^{II}, although absorption increases if nickel is added.

Introdução

Cefalosporinas e penicilinas apresentam semelhantes estruturas beta-lactâmicas. Uma vez que os métodos de análise quantitativa, empregados para o ensaio das penicilinas se baseiam, primariamente, na presença do anel beta-lactâmico, há possibilidade de sua aplicação a algumas cefalosporinas: cefazolina, cefalexina, cefalotina, cefapirina e cefradina (Oliveira, T.J.G., no prelo). Neste trabalho foram estudadas adaptações dos métodos de ensaio (6, 10, 13) já descritos para penicilinas, à cefazolina.

Material e Métodos

Amostra - Cefazolina na forma de matéria prima pura, gentilmente fornecida pelo Laboratório Eli Lilly do Brasil Ltda.

Os métodos iodométrico, colorimétrico e do peróxido de hidrogênio, usados para o controle de qualidade de penicilinas e aplicados à cefazolina, foram os já publicados (6, 10, 12; Oliveira, T.J.G., no prelo).

Preparo da solução de cefazolina: método iodométrico - solução contendo 500 mcg/ml; método do peróxido de hidrogênio - solução 6mM; método colorimétrico - concentração 2M.

Foram determinados os limites de confiança (5) e efetuada a análise de regressão ($p = 0,05$) dos resultados (5), para determinar a precisão dos métodos empregados.

* Dissertação de Mestrado em Farmácia, Deptº de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde UFPE, com auxílio da CAPES.

Resultados e Discussão

Método iodométrico - Os resultados, em duas séries de dez ensaios consecutivos, com ou sem solução tampão, estão expressos em mililitros de iodo consumidos pelos produtos de hidrólise alcalina da cefazolina (Tabela 1).

Apesar de Alicino (1) ter empregado o método iodométrico, sem utilizar solução tampão, para dosear a Cefalosporina C, os resultados encontrados nesta pesquisa confirmam a necessidade de juntar tampões (2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 13), para resultados mais exatos nos ensaios com solução tampão, os produtos da hidrólise da molécula da cefazolina consumiram maior quantidade de iodo.

Os limites de confiança para os ensaios de cefazolina foram $3,19 \pm 0,14$, com solução tampão e $2,23 \pm 0,07$, sem solução tampão o que mostra que os ensaios sem solução tampão foram mais reprodutíveis.

Método do peróxido de hidrogênio - A técnica que melhor se adaptou à cefradina (Técnica C - Oliveira, T.J.G., no prelo) foi usada para a cefazolina, em 10 ensaios sucessivos, utilizando 60 minutos para o período de repouso. O volume de NaOH 0,1N consumido foi $2,13 \pm 0,08$ ml.

A análise de regressão, aplicada aos resultados dos ensaios efetuados, em 5 concentrações diferentes de cefazolina (Figura 1), não rejeitou os pontos analisados, indicando que o método do peróxido de hidrogênio pode ser incluído entre os métodos de escolha para o doseamento de cefazolina.

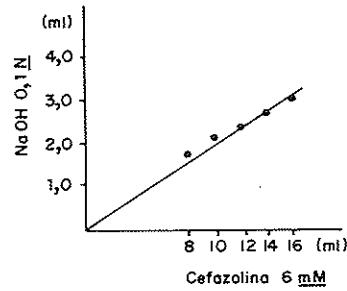
Tabela 1 - Ensaios de cefazolina realizados pelo método iodométrico

Ensaios	Tampão	
	com	sem
Vol. I ₂	3,1	2,2
0,05N	2,9	2,2
consumi- dos (ml)	3,2	2,3
3,1	2,3	
3,4	2,5	
3,0	2,3	
3,3	2,3	
3,2	2,4	
3,4	2,4	
3,3	2,3	
Límites de con- fiança	$3,19 \pm 0,14$	$2,32 \pm 0,07$
Desvio padrão	0,17	0,09

Tabela 2 - Ensaios de cefazolina realizados pelo método colorimétrico

Hidroxilamina	nm	Absor- bâncias	Limites de confiança		Desvio padrão
			com	níquel II	
sem		0,247			
níquel II	455	0,235 0,237 0,240 0,248	0,2414 $\pm 0,007$	0,006	
com		0,271			
níquel II	480	0,269 0,277 0,273 0,279	0,2738 $\pm 0,005$	0,004	

Figura 1 - Relação entre concentrações de cefazolina e hidróxido de sódio 0,1N consumido



Método colorimétrico - As leituras de absorbâncias dos ensaios de cefazolina, com hidroxilamina e com hidroxilamina-níquel II, juntamente com os respectivos comprimentos de onda, nos quais ocorreu a maior absorbância, bem como o resultado de sua análise estatística, são apresentados na Tabela 2.

Para algumas cefalosporinas, Mays & col. (10) recomendam que as leituras das absorbâncias sejam efetuadas a 470nm. Entretanto, nas condições utilizadas nestas experiências a maior absorbância para a cefazolina ocorreu a 455nm nos ensaios realizados com hidroxilamina e a 480nm naqueles com hidroxilamina-níquel II. Por outro lado, para a cefradina (Oliveira, T.J.G., no prelo) a maior absorbância ocorreu a 450nm em ambos tipos de ensaios.

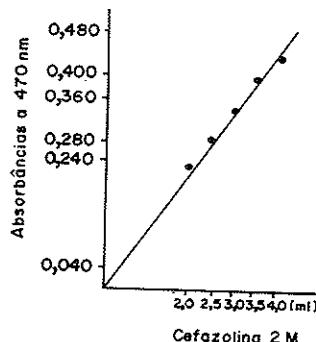
No presente caso, nos ensaios realizados com adição de níquel II as leituras de absorbâncias foram maiores.

Os ensaios efetuados para a elaboração da curva de calibração da cefazolina (Figura 2), bem como a análise de regressão dos resultados, que não rejeitou os pontos analisados, indicam que a técnica da hidroxilamina sem adição de níquel II se mostrou sensível para o doseamento da cefazolina.

Conclusões

Considerando os resultados obtidos sobre o doseamento da cefazolina, pode-se concluir que: a. no método iodométrico, a solução tampão ajuda a fixação do iodo pelo produto formado durante a hidrólise da molécula; b. o método do peróxido de hidrogênio pode ser incluído entre os métodos de escolha; c. o método colorimétrico, sem adição de níquel^{II} também se mostrou conveniente.

Figura 2 - Curva de calibração para a dosagem de cefazolina



Referências Bibliográficas

1. Alicino, J.F. - Iodometric assay of natural and synthetic penicillins, 6-aminopenicillanic acid and cephalosporin C. *Anal. Chem.*, 33:648-649, 1961.
2. British Pharmacopoeia. 12.ed. London, Her Majesty's Stationery Office, p.87-91, 1973.
3. European Pharmacopoeia. 3.ed. France, Maisonneuve, v.3, p.172-177, 1975.
4. Farmacopéia Brasileira. 3.ed. São Paulo, Andrei, p.195-197, 1975.
5. Farmacopéia Portuguesa. 4.ed. Lisboa, Impr. Nacional, Supl. seção E, p.1-4, 9-12, 1961.
6. Frantz, M. - Iodometric and spectrophotometric assays for cefradine after its hydrolysis with a beta-lactamase. *J. Pharm. Sc.*, 65:887-891, 1976.
7. Fukuchi, H.; Yoshida, M.; Kumagai, M.; Kitaura, T.; Takahashi, I.; Shimada, T. & Robayashi, I. - A comparative study on methods of qualitative analysis of sodium cephalotin. *Hiros. J. Med. Sci.*, 27:1-7, 1978.
8. Marrelli, L.P. - Analytical procedures for cephalosporins. In: - Flynn, E.H., ed. - *Cephalosporins and penicillins: chemistry and biology*. New York, Academic Press, p.613-616, 1972.
9. Marrelli, L.P. - Cephalexin. In: - Florey, K., ed. - *Analytical profiles of drug substances*. New York, Academic Press, v.4, p.35-36, 1975.
10. Mays, D.L.; Bangert, F.K.; Cantrell, W.C. & Evans, W.G. - Hydroxylamine determination of cephalosporins. *Anal. Chem.*, 47:2229-2234, 1975.
11. Okada, S. & Hattori, H.T. - An iodometric assay of some derivatives of 7-aminocephalosporanic acid. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 38:2186-2187, 1965.
12. Wise, W.S. & Twigg, G.H. - A rapid method for the chemical estimation of penicillin. *Analyst*, 73:393-394, 1948.
13. Yamana, T. & Tsuji, A. - Comparative stability of cephalosporins in aqueous solution: kinetics and mechanisms of degradation. *J. Pharm. Sci.*, 65:1563-1574, 1976.

DURABILIDADE DO ANTÍGENO POLISSACARÍDEO DE PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS

Celeste Fava Netto

Deptº de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Caixa Postal 4365
01000 São Paulo SP, Brasil

Ana Lúcia de Oliveira Schalch
& Celina Arruda

Seção de Sorologia
Laboratório Bio-Ciência Lavoisier
Av. Angélica, 1832
01228 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Antígenos polissacarídicos, obtidos de sete amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*, titulados em 1958, foram retitulados em 1981. As titulações foram realizadas pela mesma técnica de 1958, construindo-se linhas de regressão antígeno-complemento, obtidas com excesso de anticorpo. Os antígenos mantiveram inalteradas suas propriedades, após 23 anos de conservação em refrigerador comum, 2-4°C, em condições estéreis, sendo que, em várias ocasiões permaneceram à temperatura ambiente, durante muitas horas. Discute-se a importância desta verificação, principalmente quando relacionada com a utilização do antígeno nas provas intradermicas, de fixação do complemento e de precipitação em meio líquido.

Summary

Viability of the polysaccharidic antigen of P. brasiliensis

Polysaccharidic antigens prepared from seven different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*, were titrated again in 1981, by the same procedure used in 1958, when the antigens were obtained. Regression linear lines by plotting antigen against complement necessary for 50% hemolysis, in antibody excess, were obtained for each strain of *P. brasiliensis*. In this way it was possible to demonstrate that the immunological properties of the antigens did not change after 23 years preservation, in refrigerator under sterile conditions. This demonstration was worth of discussion mainly in correlation with the use of polysaccharidic antigens in intradermic tests, complement fixation reaction and precipitation reaction in liquid medium.

Introdução

A utilização de antígeno polissacarídico de *P. brasiliensis*, em reações de fixação do complemento, foi defendida em 1955 (2). O antígeno foi obtido após modificação, introduzida na técnica de Norden, em seus estudos sobre抗ígenos de *S. schenckii*. A modificação permitiu a utilização do antígeno em reações quantitativas de fixação do complemento, pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner, já que melhorou muito seu poder fixador. Posteriormente, o antígeno polissacarídico de *P. brasiliensis* foi usado em reações de precipitação em meio líquido, bem como, relatada a sua obtenção e características, separadamente, a partir de oito amostras do fungo (3). A utilização em provas intradérmicas foi padronizada (4). No estudo do tempo mínimo de cultivo, necessário à obtenção do antígeno, técnica de produção e extração foi republicada (5).

Os抗ígenos, preparados e titulados em 1958, foram conservados e reestudados em 1981, para verificação da durabilidade.

Material e Métodos

a. *Antígenos* - São estudados os抗ígenos polissacarídicos, obtidos, separadamente, de sete amostras de *P. brasiliensis* (AS, PTL, SN, SM, 104, 265 e 395), preparados em 1958. Não foi incluído, no presente, o antígeno da amostra 18 que foi completamente consumido.

b. *Soro positivo* - Mistura de soros humanos, provenientes de pacientes de paracoccidioidomicose, rica em anticorpos e utilizada em diluição que continha excesso de anticorpo, para fixar até nove unidades de complemento (H50).

c. *Reação de fixação do complemento* - Técnica de fixação do complemento de Wadsworth, Maltaner & Maltaner, como foi utilizada nas titulações feitas em 1958 (3). Foram determinadas as quantidades de抗ígeno, necessárias para 50% de hemólise frente a três, seis e nove unidades (H50) de complemento, em presença de excesso de anticorpo. A titulação, em presença de excesso de anticorpo, é possível, porque o sistema fornece curvas de isofixação do tipo 1 (1, 3).

Resultados

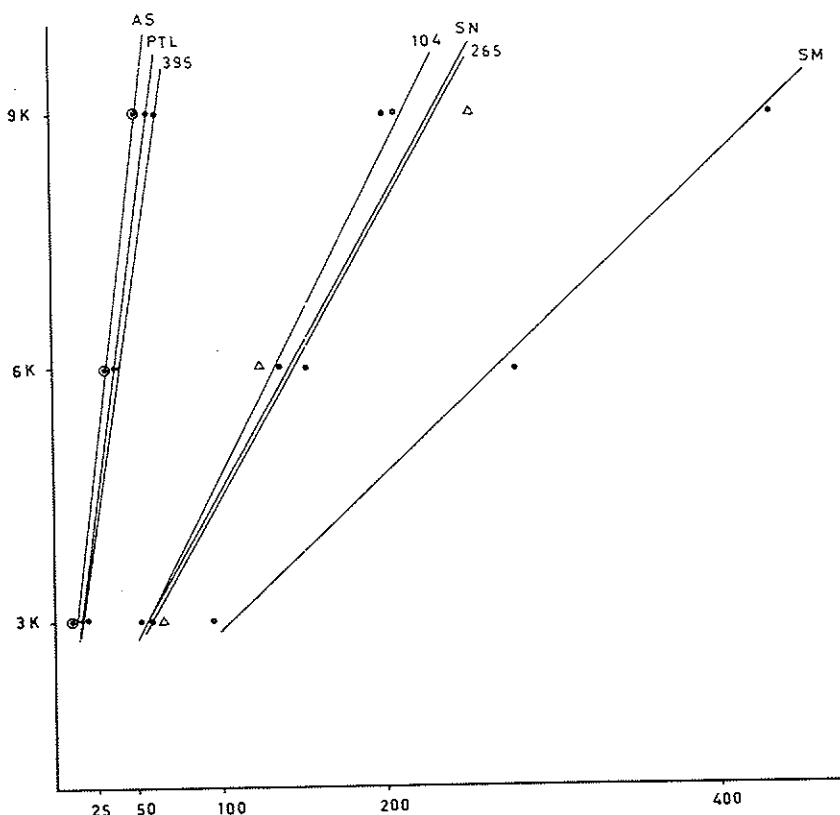
A Figura 1 representa as linhas de regressão抗ígeno-complemento, obtidas para cada uma das sete amostras de *P. brasiliensis* nas titulações realizadas em 1958, reconstruída a partir dos dados anteriores (3). A técnica das titulações bem como o modo de construção da figura já foram publicadas (3).

A Figura 2 apresenta as linhas de regressão抗ígeno-complemento, para as mesmas amostras de *P. brasiliensis* em retitulações procedidas em 1981 dos抗ígenos, preparados em 1958.

O exame das duas figuras mostra que as quantidades de抗ígeno, necessárias a 50% de hemólise frente a três, seis e nove unidades (H50), foram praticamente as mesmas nas titulações realizadas em 1958 e 1981, de cada amostra de *P. brasiliensis*. A distribuição das linhas de regressão é a mesma nas duas titulações: os抗ígenos mais potentes foram os obtidos das amostras AS, PTL e 395 e o menos potente da amostra SM. Em ambas as figuras as linhas de regressão são convergentes, indicando que as diferenças entre as várias amostras são de natureza quantitativa. A superposição das figuras, quando desenhadas sobre papel vegetal transparente, demonstrou que menores quantidades de抗ígenos foram necessárias, nas titulações realizadas em 1981 do que em 1958, para se obter 50% da hemólise com três, seis e nove unidades de complemento.

Estas pequenas diferenças, entre as duas titulações, ficaram mais evidentes quando às linhas de regressão, obtidas nas duas titulações, para uma única amostra de *P. brasiliensis*, são inscritas na mesma figura (Figuras 3 e 4), para as amostras 395 e SN.

Figura 1 - Quantidades de antígenos em 0,00001ml, necessárias para fixar 3, 6 e 9 unidades (H50) de complemento (nas ordenadas) para antígenos de 7 amostras de *P. brasiliensis* preparados e titulados em 1958



O antígeno da amostra SM parece ter sofrido qualquer alteração de natureza qualitativa, durante o período de conservação, pois as linhas de regressão se entrecruzam (Figura 5).

Discussão

Não julgamos pertinente discutir a composição dos vários tipos de antígenos já utilizados no estudo imunológico da paracoccidioidomicose. Geralmente são antígenos complexos, constituídos de extratos, lisados ou filtrados. A obtenção de fração antígenica específica, como o antígeno E₂ de Yarzábal (13), certamente representa grande progresso no estudo imunológico da paracoccidioidomicose. No entanto, a demonstração da heterogeneidade antígenica, das diferentes amostras de *P. brasiliensis* (12), bem como a heterogeneidade de resposta, de diferentes animais da mesma espécie, estão a indicar que muitos estudos são ainda necessários, para conclusão definitiva. Isto é verdadeiro, principalmente no que diz respeito à utilização dos antígenos para o diagnóstico imunológico da paracoccidioidomicose, em suas várias formas.

Quando se prepara um novo tipo de antígeno, além de demonstrar sua eficiência, em provas imunológicas, é essencial demonstrar sua viabilidade, sob várias condições de manutenção. É essencial saber da durabilidade do antígeno, quanto a seu emprego, em cada tipo de prova imunológica. Como exemplo da importância da estabilidade de atividade imunológica do antígeno, queremos citar sua utilização em provas intradérmicas. Todos conhecemos os percalços enfrentados na padronização da dose a ser injetada. Por outro lado, conhecemos as dificuldades enfrentadas no envio e conservação do antígeno, para regiões afastadas, onde se pretenda realizar investigação epidemiológica, através de provas intradérmicas.

Figura 2 - Os mesmos抗ígenos da Figura 1, retitulados em 1981. (23 anos após conservação a 2-4°C). Ordenada: complemento - unidades (H50); Abscissa:抗ígeno (0,00001ml)

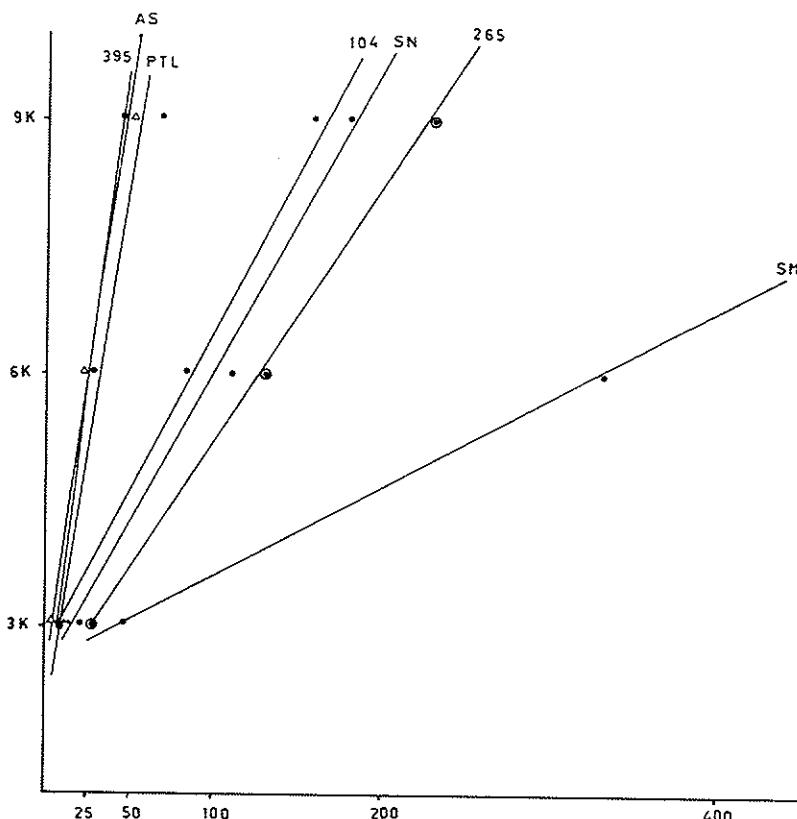
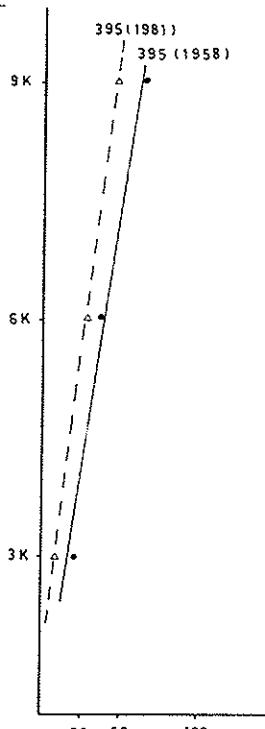


Figura 3 - Linhas de regressão obtidas nas titulações de 1958 e em 1981 para o抗ígeno da amostra 395 de *P. brasiliensis*. Ordenada: complemento - unidade (H50); Abscissa:抗ígeno (0,00001ml)



Quando um抗ígeno, destinado a exames de laboratório é comercializado, torna-se indispensável a indicação de como conservá-lo puro e após diluição, bem como a indicação de sua durabilidade, nas várias condições.

No que diz respeito aos抗ígenos, utilizados no estudo imunológico da paracoccidioidomicose, as indicações sobre a durabilidade do抗ígeno puro ou diluído são escassas. Ne-groni (8, 9) menciona que o抗ígeno filtrado mantém-se inalterado por longo tempo. Mackinnon & col. (7) dizem que a paracoccidioidina (filtrado), quando diluída, perde a atividade antigenica, após 20 dias, à temperatura ambiente. Fava Netto (3) estudou a estabilidade do抗ígeno polissacarídico, durante três anos, demonstrando que não havia perdido poder fixador nem se tornava anti-complementar, após conservação em refrigerador comum, a 2 e 4°C, durante esse período de tempo. Restrepo (10) e Restrepo & col. (11) estudaram a utilização de filtrados, em provas sorológicas de difusão em gel de ágar e em provas intradérmicas. O抗ígeno pode ser precipitado e conservado sob forma de pó, que é diluído, por ocasião de sua utilização. Este tratamento certamente poderá facilitar a conservação e durabilidade do抗ígeno.

Os presentes resultados demonstraram a estabilidade do抗ígeno polissacarídico de *P. brasiliensis*, quanto a seu poder fixador de complemento, por período de 23 anos. Sabemos que a dose, a ser utilizada em provas intradérmicas, pode ser calculada, a partir de sua atividade fixadora do complemento (6).

Figura 4 - Linhas de regressão obtidas nas titulações de 1958 e de 1981 para o antígeno da amostra SN de *P. brasiliensis*. Ordenada: complemento - unidade (H50); Abscissa: antígeno (0,00001ml)

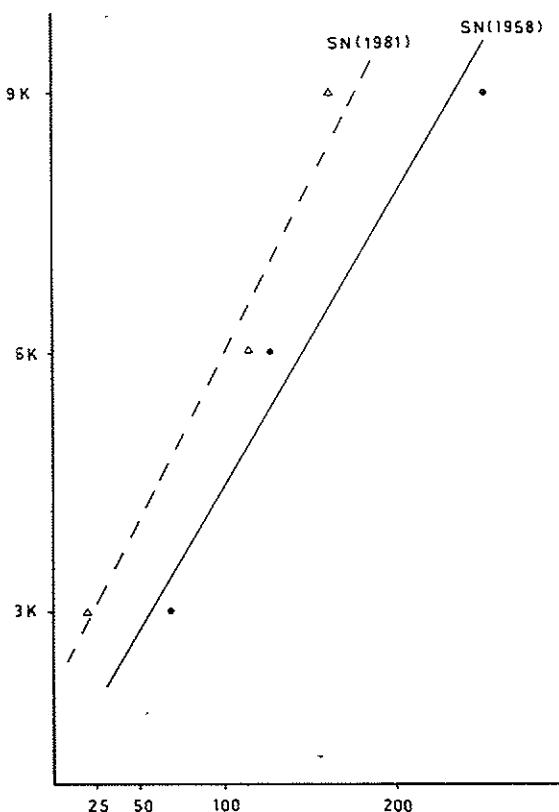
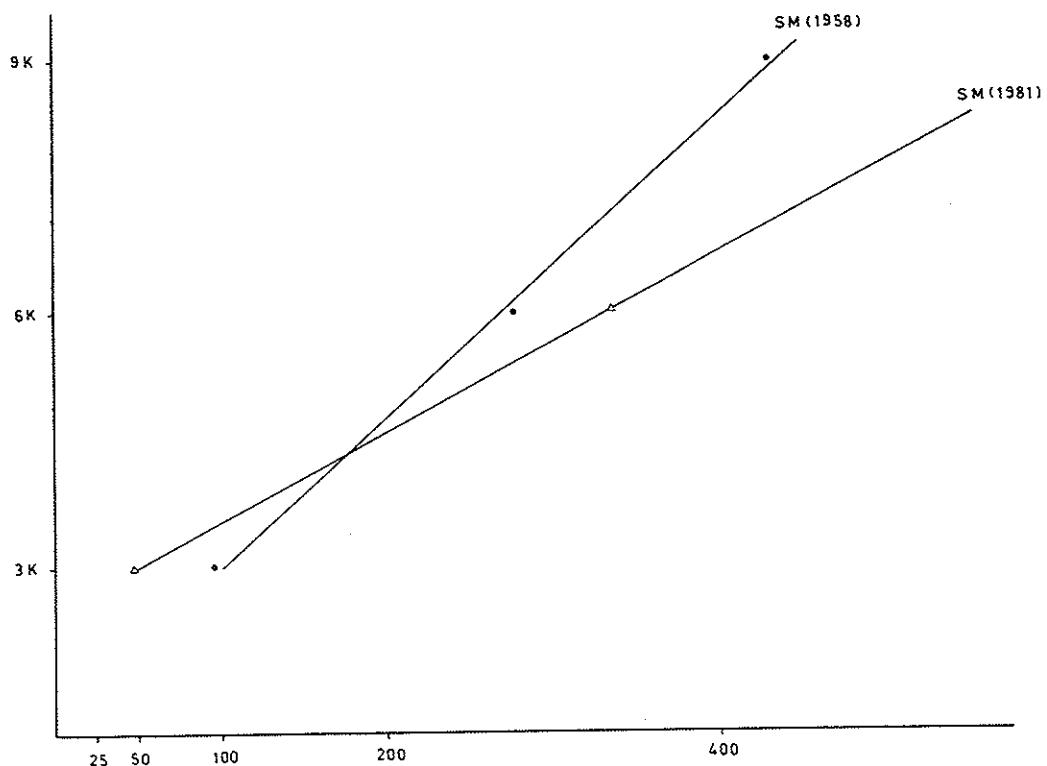


Figura 5 - Linhas de regressão obtidas nas titulações de 1958 e de 1981 para o antígeno da amostra SM de *P. brasiliensis*. Ordenada: complemento - unidade (H50); Abscissa: antígeno (0,00001ml)



O antígeno polissacarídico de *P. brasiliensis* recebeu tal denominação, a partir dos estudos iniciais de Fava Netto (2), porque, em sua composição, predominam os polissacárides. Vários estudos (não publicados), através da cromatografia gasosa e em camada delgada, indicam que os polipeptídios participam de sua composição, tendo sido comprovada a presença de dezenas de aminoácidos.

Este antígeno se presta para o estudo imunológico da paracoccidioidomicose, através das provas de fixação do complemento, de precipitação em meio líquido e das reações intradérmicas. Daí a importância da presente demonstração de sua durabilidade, após 23 anos de estocagem.

Referências Bibliográficas

1. Almeida, J.O. - Isofixation curves as a method of standardizing quantitative fixation tests. *J. Immunol.*, 76:259-263, 1956.
2. Fava Netto, C. - Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. *Arq. Cir. Clin. Exp.*, 18:197-254, 1955.
3. Fava Netto, C. - Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (blastomicose sul-americana). *Rev. Inst. A. Lutz (S.Paulo)*, 21:99-194, 1961.
4. Fava Netto, C. & Raphael, A. - A reação intradérmica com polissacaríde do *Paracoccidioides brasiliensis*, na blastomicose sul-americana. *Rev. Inst. Med. Trop. (S.Paulo)*, 3:161-165, 1961.
5. Fava Netto, C.; Vegas, V.S.; Scianiamia, I.M. & Guarnieri, D.B. - Antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis*: estudo do tempo de cultivo do *P. brasiliensis*, necessário ao preparo do antígeno. *Rev. Inst. Med. Trop. (S. Paulo)*, 11:177-181, 1969.
6. Fava Netto, C.; Guerra, M.A.G. & Costa, E.O. - Contribuição para o estudo imunológico da paracoccidioidomicose: reações intradérmicas em pacientes com dois抗ígenos homólogos e dois heterólogos. *Rev. Inst. Med. Trop. (S. Paulo)*, 18:186-190, 1976.
7. Mackinnon, J.E.; Artagaveytia-Allende, R.C. & Arroyo, L. - Sobre la especificidad de la intradermorreacción con paracoccidioidina. *An. Fac. Med. Montevideo*, 38:363-382, 1953.
8. Negroni, R. - Observaciones personales sobre la micosis de Lutz (Blastomycosis sudamericana) en Argentina. Buenos Aires, 1968. (Tesis de Doctorado).
9. Negroni, R. - Nuevos estudios sobre antígenos para las pruebas serológicas en la blastomicosis sudamericana. *Derm. Ibero Lat. Amer.*, 4:409-416, 1968.
10. Restrepo, A.M. - La prueba de inmunodifusión en el diagnóstico de la paracoccidioidomicosis. *Sabouraudia*, 4:223-230, 1966.
11. Restrepo, A.M. & Schneideau, J.A. - The nature of the skin-reactive principle in culture filtrates obtained from *P. brasiliensis*. *J. Bacteriol.*, 93:1741-1748, 1967.
12. Scroferneker, M.L. - Contribuição para o estudo da composição antigenica do *Paracoccidioides brasiliensis*: comparação entre 5 amostras. São Paulo, Deptº de Microbiologia e Imunologia do ICB/USP, 1982. (Tese de Doutorado).
13. Yarzábal, L. - Composición antigenica de *Paracoccidioides brasiliensis*. In: - Del Negro, G.; Lacaz, C. da S. & Fiorillo, A.M. - Paracoccidioidomicose: blastomicose sul-americana. São Paulo, Sarvier/EDUSP, p.59-67, 1982.

YERSINIA ENTEROCOLITICA EM FEZES DE CRIANÇAS COM DIARRÉIA AGUDA

Marina Baquerizo Martinez
 & Roberto Araújo de Almeida Moura

Deptº de Análises Clínicas e Toxicológicas
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
 Caixa Postal 30786
 01000 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Yersinia enterocolitica foi pesquisada em 122 amostras de fezes de crianças que apresentavam diarréia aguda. Após o enriquecimento, em tampão fosfato por 3 semanas, as amostras de fezes foram semeadas em placas em meio Y e incubadas a 28°C por 48 horas. Houve apenas um isolamento (0,8%) de *Y. enterocolitica*.

Summary

Yersinia enterocolitica in children with acute diarrhoeae

Yersinia enterocolitica was searched in 122 stool samples of children, showing diarrhoeae. After three weeks enrichment in phosphate buffer at 4°C, the stool samples were inoculated in Y medium and incubated at 28°C during 48 hours. Only one *Y. enterocolitica* was found among all sample analysed.

Yersinia enterocolitica é uma das principais causas de enterites, nos países escandinavos e no Canadá. No Brasil, o primeiro isolamento de origem humana deu-se em 1976 (Piszolitto, A.C.; Falcão, D.P.; Shimizu, M.T.; Galvão, S.H.M. & Giraldini, E. - Contr. Microbiol. Immunol., 5:169-173, 1979). Posteriormente, outros casos humanos foram relatados em São Paulo e Rio de Janeiro (Fontes, C.F.; Toledo, M.R.F.; Reis, M.H.L.; Murahovschi, J. & Trabulsi, L.R. - Rev. Microbiol. (São Paulo), 9:167-168, 1978. Decarlis, M.R.S.T.; Falcão, D.P.; Maffei, H.V. & Pavan, C. - Rev. Microbiol. (São Paulo), 13:50-52, 1982. Stumpf, M.; Ricciardi, I.D.; Oliveira, N.; Sabará, A. & Bernhoeft, M. - Rev. Bras. de Pesquisas Med. Biol., 11:383-384, 1978).

Foram estudadas 122 amostras de fezes de crianças, de 0 a 3 anos de idade, apresentando diarréia aguda, atendidas no Hospital Universitário de São Paulo.

Em paralelo à técnica usual de isolamento de enterobactérias, utilizando fezes recentemente emitidas, foi seguida a técnica preconizada por Soltész (Soltész, L.V.; Schalén, C. & Mardh, P. - Acta Path. Microbiol. Scand Sect., 88:11-16, 1980).

Ocorreu apenas um isolamento (0,8%) de *Y. enterocolitica*, unicamente no meio de Soltész, com colônias pequenas, não fermentadoras de lactose. As provas bioquímicas, realizadas a 28°C, mostraram que a cepa isolada apresentava comportamento típico da espécie, a saber: cellobiose +; lactose -; melibiose -; ramnose -; sacarose +; trealose +; glicose (ácido) +; glicose (gás) -; uréia +; indol -; H₂S (TSI) -; VM 28°C +; VM 27°C +; VP 28°C -; VP 37°C -; motilidade 28°C +; motilidade 37°C -; lisina descarboxilase -; arginina dihidrolase -; ornitina descarboxilase +; ONPG 28°C +; ONPG 37°C +; oxidase -; fenilalanina desaminase - (temperatura de incubação 28°C, quando não especificada; + reação positiva dentro de 1 a 2 dias; - reação ne-

gativa).

A tipagem identificou-a como pertencente ao sorotipo 0:3. O antibiograma (Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. - Amer. J. Clin. Path., 45:493-496, 1966), revelou ser a amostra sensível a tetraciclina, cloranfenicol, carbenicilina, canamicina, colistina, sulfametoxazol-trimetropirim, sulfadiazina, neomicina, sulfato de gentamicina, cefoxitina, amicacina e resistente a ampicilina e cefalotina.

Pelos dados obtidos e pela literatura nacional, a ocorrência desta bactéria, em nosso meio, é baixa. O inverso acarretaria problemas no diagnóstico de diarréia. O tempo de enriquecimento de amostras de fezes é longo (21 dias), o que dificulta a introdução deste método, rotineiramente, para o isolamento de *Y. enterocolitica* em casos de diarréia, pelos laboratórios de análises clínicas não ligados à Saúde Pública. Segundo Niléhn (Niléhn, B. - Acta Path. Microbiol. scand. (Suppl 206):1-48, 1969), o sucesso no isolamento de *Y. enterocolitica* depende muito do tipo do material analisado. Quando se trata de hemoculturas e de culturas de linfonodos mesentéricos, por exemplo, não mostra maiores dificuldades. Contudo, com materiais com flora mista, é aconselhável o uso de meios seletivos e de enriquecimento.

SEROTYPES AND EXTRACELLULAR HYALURONIDASE OF GROUP A STREPTOCOCCI

Leslie C. Benchetrit
Cassia Carneiro Avelino
César Martins de Oliveira

Dept. of Medical Microbiology
Institute of Microbiology UFRJ
Ilha do Fundão
21944 Rio de Janeiro RJ, Brazil

& Louis Barrucand

Dept. of Pathology
Faculty of Medicine UFRJ
Ilha do Fundão
21944 Rio de Janeiro RJ, Brazil

Summary

Examination of 69 strains of group A streptococci for extracellular hyaluronidase production revealed a direct correlation between bacterial growth and formation of the enzyme ($r=0.95$) as the maximum production was reached at a time when there was a maximum in the turbidity of the culture. Results confirm the observation that all group A streptococcal M types elaborate the enzyme *in vitro*. However high-hyaluronidase production was not found to be restricted to certain serotypes.

Resumo

Sorotipos e hialuronidase extracelular em estreptococos do grupo A

Avaliação da hialuronidase extracelular em 69 cepas de estreptococos do grupo A mostrou que o crescimento das bactérias e a produção da enzima são correlacionados ($r=0.95$), sendo que a formação máxima desta corresponde à máxima turbidez da cultura. Embora confirmado que todos os estreptococos do grupo A, M-tipáveis, elaboram a enzima "in vitro", não foi verificado que a maior produção de hialuronidase esteve restrita a certos tipos.

Introduction

Investigations on the extracellular hyaluronidase of group A streptococci have been directed toward elucidating the participation of the product in the pathogenic mechanism(s) of the microorganisms. Differences have been found in the *in vitro* production by M types of streptococci as strains belonging to types 4 and 22 were shown to be higher-enzyme producers (7, 11). However antibodies for streptococcal hyaluronidase have been looked for and found in sera of many patients following an infection by a variety of M types of group A streptococci (5, 11). Thus it appears

that the many strains of infecting group A streptococci have equal capabilities for producing the hyaluronidase *in vivo*. This curious situation called attention to the need for additional studies on this streptococcal product. We present here data on the *in vitro* production of the enzyme by strains of various types of group A streptococci. We studied newly recognized types and more than one strain for certain types. The formation of the enzyme during bacterial growth was also investigated.

Material and Methods

Streptococcal strains - Sixty nine strains were assayed for hyaluronidase and have been described in previous publications (1, 2). T and M typing were performed only after assay of the enzyme. All but 2 strains were T-typable and 41 were M-typable.

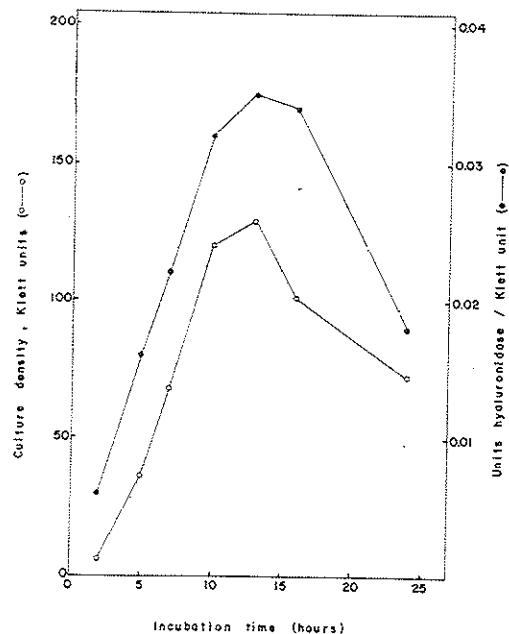
Assay for hyaluronidase production by streptococcal strains - A single colony was inoculated into 5ml of a Todd-Hewitt dialysate medium (1) and streptococci were grown for 16 hours at 37°C. A subculture was then made with a 1% inoculum and bacterial growth was allowed to proceed at 37°C for 16 hours. Cultures were vigorously mixed and optical density of the cell suspension was measured in a Klett-Summerson colorimeter equipped with the green filter (1). Thereafter bacterial cells were removed by centrifugation. The supernatants thus obtained were tested for enzyme activity by the method of Benchetrit & col. (3) and the specific activity was expressed as units of hyaluronidase per unit of optical density of the culture (1).

Statistical analysis - Values for bacterial growth (Klett units) and hyaluronidase production (specific activities) were submitted to the Fisher's correlation test. The sigmoidal curves prepared from the variables of the respective gaussian curves were transformed into probits and used to calculate the time needed for maximum growth and enzyme production to occur.

Results

Hyaluronidase activity during bacterial growth - The following experiment was designed to detect and quantitate hyaluronidase production during growth of an M-4 T-4 streptococcus. The strain was grown in a 100ml quantity of medium. At various times during the incubation, bacteria were harvested and culture supernates were prepared (1). The time course of enzyme production expressed in

Figure 1 - Bacterial growth and hyaluronidase production. A culture of an M 4 streptococcus was incubated at 37°C and samples withdrawn at various times (times: 2, 5, 7, 10, 13, 16 and 24 hours) after inoculation of the dialysate medium with a small inoculum (1%). Optical densities of the samples were measured and culture supernatants were then prepared and assayed for enzyme activity (1)



term of enzyme specific activity is illustrated in Figure 1. The increase in hyaluronidase formation and the increase in the culture paralleled each other during the period of logarithmic growth. Levels of enzyme specific activities achieved a 6-fold increase at the peak of this period.

Statistical analysis - There was a fairly high degree of correlation between the two series of variables (turbidity of the culture and enzyme production, $r=0.95$, $p<0.01$). Probit calculations indicated that maximum turbidity was reached at 13 hours and maximum hyaluronidase production at 12.6 hours. Production of hyaluronidase by the remaining 68 strains of streptococci was determined in supernates of 16-hour cultures as there was no significant difference in specific enzyme levels at 12.6 and 16 hours.

Production of enzyme by serotypes of streptococci - Of the 69 strains examined, 68 produced hyaluronidase at levels ranging from 0.1 to 0.056 units of enzyme per unit of optical density (Table 1). All strains of M-types 12, 69 and 74 produced enzyme. The strain that did not produce hyaluronidase was an M-type 49. However one strain of the same type did produce the enzyme. Six of the 7 T-type 11 strains were not M-typable and produced hyaluronidase.

Discussion

Production of the enzyme hyaluronidase by group A streptococci has been reported by several authors. Evidence was found for extracellular production by M-types 1(5, 10), 3, 6, 14, 18, 39(9), 4, 22(4, 7), 5, 10, 11(19), and 12, 38 and 44(5). Pike (8) described the production of hyaluronidase without determination of the M types of the strains tested. The percentage of enzyme-producing strains in these studies ranged from 6 to 55%. Faber and Rosendal (6), reported that only two (M types and 9 and 24) of 40 types did not produce the enzyme (6). Gerlach & Köhler examined 33 M types and demonstrated that only types 4, 5, 19, 22, 24, 25 and 28 were capable of producing the enzyme (7).

In the present study, we have assured near maximum enzyme production (or release) by allowing the cultures to grow at 37°C for 16 hours. We have also used a very sensitive assay for hyaluronidase activity (1, 3). This has also allowed for demonstration of enzyme activity in culture supernates of the 30 types of group A streptococci tested (and available at the time the study was undertaken). In addition 68 of the 69 strains we examined were hyaluronidase-producers. According to our survey for hyaluronidase formation by group A streptococcal serotypes, 57 of the 59 known M-types tested produce the enzyme.

Table 1 - Hyaluronidase enzyme present in culture supernates of 69 strains of group A streptococci.

Symbols: a. ND = not detected; b. NT = not typable with available antisera (2)

strain number	Serotype		S.a.*
	M	T	
76603 (C203 S)	3	1	0.047
75194	4	4	0.034
78140	5	5/27/44	0.048
79040	11	11	0.022
GT 6898	12	12	0.025
GT 9211 S	12	12	0.020
GT 8761 (K56)	12	12	0.040
GT 7817	12	12	0.020
79297	12	12	0.012
71690	18	9/18	0.022
71806	22	22	0.019
71694	24	4	0.040
GT 6271	28	28	0.018
79301	32	3/13/B3264	0.020
79068	32	3/13/B3264	0.020
79055	33	3/13/B3264	0.020
71715	48	4/28	0.036
GT 9278	49	49	ND ^a
GT 8760	49	49	0.031
71717	50	4/28	0.015
71719	52	8/25	0.026
78052	53	3/13/B3264	0.026
71724	57	8/25	0.040
78234	58	25	0.020
79037	60	4	0.023
72465	62	11/12/27	0.018
72453	63	4	0.025
72392	64	ND ^b	0.032
75412	65	NT	0.020
76182	66	12	0.025
75414	67	9/28	0.038
75415	68	1	0.020
75416	69	3	0.038
78021	69	3/13/B3264	0.018
79187	69	3/13/B3264	0.020
75417	70	28	0.010
75418	71	9/18	0.035
79296	74	9/3/13/B3264	0.020
79223	74	9/3/13/B3264	0.020
79290	74	9/3/13/B3264	0.018
79278	74	9/3/13/B3264	0.043
79300	NT	3	0.024
78082	NT	3/13/B3264	0.056
79315	NT	B3264/9/44	0.016
78129	NT	2	0.024
79215	NT	4	0.027
78118	NT	4	0.020
79270	NT	6	0.026
78037	NT	28	0.016
79317	NT	5/25/44	0.018
78045	NT	5/27/44	0.019
78025	NT	5/27/44	0.019
78019	NT	11	0.027
79015	NT	11	0.010
79019	NT	11	0.018
79154	NT	11	0.020
79298	NT	11	0.020
79039	NT	11	0.012
79314	NT	12	0.028
78124	NT	12	0.021
79057	NT	14	0.023
79247	NT	14	0.020
79045	NT	8/25/Imp. 19	0.019
79189	NT	8/25/Imp. 19	0.020
79190	NT	8/25/Imp. 19	0.020
78053	NT	8/25/Imp. 19/2	0.018
79023	NT	8/25/Imp. 19/4	0.018
79010	NT	11/12/5/27/44	0.024
79009	NT	14/3/13/B3264	0.032

Hyaluronidase elicits antibodies that are useful in the establishment of group A streptococcal infections (9, 11, 12). Because high anti-hyaluronidase titers were reported for only a few types causing the infection (5, 11) additional studies should be useful to determine the factor(s) that may influence the in vivo release of the enzyme by these strains.

Acknowledgments

This study was supported by grants from CNPq (to Dr. Benchetrit), FINEP and CEPG/UFRJ. Cassia Carneiro Avelino was a recipient of a fellowship from CAPES when this study was undertaken.

References

1. Benchetrit, L.C.; Avelino, C.C. & Oliveira, C.M. - Effect of subminimal inhibitory concentrations of penicillin on hyaluronidase production by group A streptococci. *Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg.*, 251:152-156, 1981.
2. Benchetrit, L.C.; Facklam, R.R. & Teixeira, L.M. - Serological characterization of group A streptococci in Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo)*, 24:277-281, 1982.
3. Benchetrit, L.C.; Pahuja, S.L.; Gray, E.D. & Edstrom, R.D. - A sensitive method for the assay of hyaluronidase activity. *Anal. Biochem.*, 79:431-437, 1977.
4. Crowley, N. - Hyaluronidase production by hemolytic streptococci of human origin. *J. Pathol. Bacteriol.*, 56:27-53, 1944.
5. Di Caprio, J.M.; Rantz, L.A. & Randall, E. - Studies on streptococcal hyaluronidase and antihyaluronidase. *Arch. Intern. Med.*, 89:374-386, 1952.
6. Faber, V. & Rosendal, K. - Streptococcal hyaluronidase. II - Studies on the production of hyaluronidase and hyaluronic acid by representatives of all types of hemolytic streptococci belonging to group A. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 35:159-164, 1954.
7. Gerlach, D. & Köhler, W. - Hyaluronate lyase from *Streptococcus pyogenes*. I - The production and isolation of hyaluronate lyase. *Abl. Bakt. Parasintek. Infekt. Krank. Hyg.*, 221:166-172, 1972.
8. Pike, R.M. - Streptococcal hyaluronic acid and hyaluronidase. I - Hyaluronidase activity of nonencapsulated group A streptococci. *J. Infect. Dis.*, 83:1-11, 1948.
9. Quinn, R.W. - Antihyaluronidase studies of sera from patients with rheumatic fever, streptococcal infections and miscellaneous non-streptococcal diseases. *J. Clin. Invest.*, 27:471-475, 1948.
10. Sallman, B. & Bierkeland, J.M. - The role of hyaluronidase in hemolytic streptococcal infection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 52:2062-2069, 1950.
11. Wannamaker, L.W. & Ayoub, E.M. - Antibody titers in acute rheumatic fever. *Circulation*, 21:598-614, 1960.
12. Watanabe, N. - Antihyaluronidase level in children with rheumatic fever and other streptococcal infection. *Jap. Heart J.*, 17:580-591, 1976.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Strathern, J.N.; Jones, E.W. & Broach, J.R., eds. - The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: life cycle and inheritance. New York, Cold Spring Harbor Laboratories, 751p., 1981. US\$90.00

O livro consiste de revisões sobre aspectos da biologia molecular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente os relacionados a seu ciclo celular e herança extracromossômica. Em um segundo volume, já programado pela Cold Spring Harbor, serão abordados outros assuntos, envolvendo o metabolismo e expressão gênica nessa levedura. Os capítulos iniciais apresentam revisões sobre *Saccharomyces cerevisiae* como um sistema genético, técnicas de mapeamento, estrutura gênica da levedura e sua replicação, sua citologia e seu ciclo celular, o controle de seus tipos de reação sexual e o desenvolvimento dos esporos sexuais, o fenômeno da conversão gênica e a recombinação mitótica e a mutagenese e mecanismos de reparo do DNA. Os assuntos são tratados em um nível elevado, porém de modo claro, bem ilustrado e repleto de referências bibliográficas. Esses capítulos são de autoria de especialistas, muitos deles que fizeram ou fazem a história da genética de microrganismos, em geral e das leveduras, em particular. Nos capítulos que se seguem, são abordados aspectos bem atuais e relacionados com a herança extracromossônica, incluindo-se revisões sobre linhagens "killer" de *S. cerevisiae*, sobre o plasmídio 2m de grande interesse para a engenharia genética, sobre a estrutura das mitocôndrias e sobre a genética de mitocôndrias e suas funções em leveduras. Esse último capítulo é por si só um livro dentro do próprio livro, com 120 páginas com informações atuais e cerca de 700 referências bibliográficas. É um livro de alto nível, que representa a puljança da genética de leveduras. Ao lado das obras de Hayes e de Glass, sobre genética bacteriana e seus bacteriófagos, de Fincham & col., sobre genética de fungos, principalmente os filamentosos, o presente livro, junto com o seu segundo volume, deve se constituir em material de consulta indispensável, nas bibliotecas especializadas em genética e microbiologia. Além dos que trabalham na área, deve servir também aos estudantes de pós-graduação que desenvolvem pesquisas nessa importante e dinâmica área de conhecimento.

João Lúcio de Azevedo
Instituto de Genética
ESALQ - USP
Caixa Postal 83
13400 Piracicaba SP

Brasil. Ministério da Saúde. A saúde no Brasil, 1(2):1-64, Jan./Mar. 1983.

"A Saúde no Brasil" é uma publicação trimestral, feita pelo Ministério da Saúde, através do Centro de Documentação e que, de acordo com seus editores, está destinada a promover debates e a suscitar críticas, mesmo que estas contrariem posições do próprio Ministério. A revista é dirigida a um público selecionado, composto de profissionais de saúde, jornalistas especializados, políticos, estudiosos do assunto, estudantes e técnicos, em geral e espera publicar, em cada número, vários enfoques sobre um mesmo assunto, buscando ocupar um espaço não utilizado pela imprensa tradicional.

O primeiro número de "A Saúde no Brasil", sobre poliomielite, procura alcançar as metas propostas. São sete artigos, assinados por pesquisadores nacionais e estrangeiros, da maior proeminência neste campo, apresentados por uma introdução que traga breve histórico da poliomielite no Brasil.

O primeiro é assinado pelo Dr. João Bastista Risi Junior, atual Secretário Nacional de Ações Básicas de Saúde e descreve o controle da poliomielite entre nós, a estratégia utilizada pelo Ministério da Saúde, nos dias nacionais de vacinação, os resultados obtidos, a situação epidemiológica atual e a vigilância necessária, para obter as informações precisas para uma correta avaliação.

Rev. Microbiol., São Paulo, 15(1):39-40, Jan./Mar. 1984.

O segundo trabalho, do Dr. Nelson Moraes, "Vacinação em massa ou de rotina" complementa o anterior, discutindo as estratégias, empregadas pelo Ministério da Saúde, de acordo com as nossas condições sanitárias.

O terceiro artigo, do Dr. Jonas Salk e o quarto artigo do Dr. Albert Sabin discutem as indicações e contra-indicações das duas vacinas de poliovírus, a de vírus não infeccioso (inativado) e a de vírus atenuados, cada um advogando o tipo de vacina que escolheram para aperfeiçoar. O Dr. Sabin imputa, a uma possível divisão climática, algumas das falhas observadas na vacinação com vírus atenuados, justificando a necessidade de Campanhas de Vacinação em massa, bem organizadas, procurando atingir a quase todas as crianças, enquanto o Dr. Salk argumenta que uma possível erradicação desta moléstia somente será obtida pela utilização da vacina inativada.

O trabalho seguinte, do Dr. Hermann Schatzmayer, aborda a poliomielite post-vaccinal e a vigilância epidemiológica, estabelecida para detectar tais casos e segue-se o artigo do Dr. Akira Horita sobre a fabricação de uma possível vacina brasileira contra a poliomielite, justificando a produção desta entre nós, devido a um mercado cativo, representado pelo acréscimo anual à população de 3,5 milhões de crianças. É apresentada a estratégia que está sendo executada na FIOCRUZ/Bio-Manguinhos para a produção desta vacina.

O último trabalho desta revista é, sem dúvida, o mais polêmico. Trata-se de artigo do Dr. Aloysio Campos da Paz Jr. & col. contestando, de maneira lógica, os métodos tradicionais de recuperação de doentes portadores de sequelas de poliomielite. As deformidades físicas podem apresentar um complexo mecanismo de compensação, o que torna discutível a validade dos procedimentos corretivos, devido à quebra da interação estabelecida entre as deformidades e o processamento cerebral de compensação e, então, o preço que o paciente paga é sempre uma perda de eficácia e de velocidade. Os autores propõem, então, uma nova atitude de convivência com a deformidade e não a busca de uma normalidade questionável.

"A Saúde no Brasil" é, a julgar pelo primeiro número, uma revista bem cuidada quanto a apresentação gráfica, com artigos de alta qualidade, expostos em linguagem clara e acessível, atingindo plenamente os objetivos delineados por seus editores.

Oscar de Souza Lopes
FIOCRUZ
Caixa Postal 926
20010 Rio de Janeiro RJ



Fotótipos e Impressão



Avenida Boaer, 64
Vila das Mercês São Paulo
Fone: 914-0233
CEP 04298

