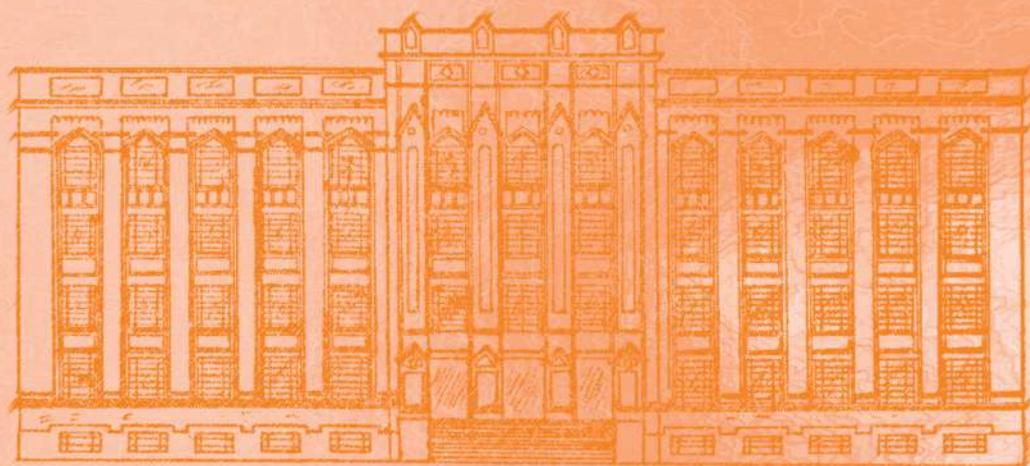


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



Volume 67 número 2, 2008



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE



Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz

**REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ**

Publicação quadrimestral/Quadri-annual publication
Solicita-se permuta/Exchange desired

Volume 67 número 2, 2008

ISSN 0073-9855

Maio – Agosto - 2008

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz
Marta Lopes Salomão

Editor Chefe

Thaís Valéria Milanez

Editor Adjunto

Adriana Bugno

Editores Assistentes

Cecília Cristina Marques dos Santos
Cristina Takami Kanamura
Luzia Setuko Umeda Yamamoto
Raquel dos Anjos Fazioli
Sônia França Correia Barbosa
André Gustavo Tempone Cardoso
Márcia Bittar Atuí

Conselho Editorial/Editorial Board

Adele Caterino de Araújo, São Paulo, Brasil.
Alexandre Januário da Silva, Atlanta, EUA
Antonio Ruffino Netto, Ribeirão Preto, Brasil.
Bernadette Dora G. de Melo Franco, São Paulo, Brasil.
Delia Rodrigues Amaya, Campinas, Brasil.
Eliseu Alves Waldman, São Paulo, Brasil.
Elizabeth Castañeda, Bogota, Colômbia.
Elizabeth de Souza Nascimento, São Paulo, Brasil.
Fernando C. Schmitt, Porto, Portugal.
Gordon S. Shephard, Cape Town, África do Sul.
Guilherme Prado, Belo Horizonte, Brasil.
Hans P. van Egmond, Bilthoven, Holanda.
Heitor Franco de Andrade Junior, São Paulo, Brasil.
John Gilbert, York, UK.
Juan Carlos Palomino, Antuérpia, Bélgica.

Lígia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.
Luz Elena Cano Restrepo, Medellín, Colômbia.
Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.
Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.
Martin Emilio Munk, Copenhagen, Dinamarca.
Myrna Sabino, São Paulo, Brasil.
Paul W. Flinn, Kansas, EUA.
Pedro Paulo Chieffi, São Paulo, Brasil.
Regina Maura Bueno Franco, Campinas, Brasil.
Susana Córdoba, Buenos Aires, Argentina.
Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, São Paulo, Brasil.
Thalés de Brito, São Paulo, Brasil.
Vanessa Yardley, London, UK.
Venâncio Avancini Ferreira Alves, São Paulo, Brasil.
Vera Akiko Maihara, São Paulo, Brasil.
Vera Lucia Garcia Calich, São Paulo, Brasil.

Setor de Publicações

Rocely Aparecida Bueno Moita

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ
(Secretaria de Estado de Saúde)
São Paulo, SP – Brasil, 1941

1941-2007
2008, 67 (2)

ISSN 0073-9855
RIALA 6

CDD₁₈ 614.07205

(*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed. Polígono, 1072.

Os artigos publicados na REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ são indexados por Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases, AGRINDEX., Analytical Abstracts, Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootécnica, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Food Science and Technology Abstracts, Index Medicus Latino-americano, LILACS/SP: Saúde Pública, Microbiology Abstracts, Sumários Correntes Brasileiros, Toxicology Abstracts, Tropical Diseases Bulletin, Virology Abstracts e outros.

Acesso on line/on line access. texto integral/full text. <http://revista.ial.sp.gov.br>

Endereço/Address

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 São Paulo/SP - Brasil
Tel.: 3068-2869 – Fax: (11) 3082-9939
E-mail: rial@saude.sp.gov.br

Apoio:



Ministério
da Educação

Ministério da
Ciência e Tecnologia



INSTRUÇÃO AOS AUTORES

A REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (RIAL) tem por finalidade a divulgação de trabalhos relacionados com as atividades laboratoriais em Saúde Pública.

1. Missão: esta revista tem como missão divulgar resultados de investigações científicas tanto básicas como aplicadas inclusive tecnológicas, abrangendo as diversas áreas de interesse em saúde pública, na forma de artigos originais, artigos de revisão, comunicações breves, notas científicas, relatos de caso, resumos de teses e dissertações.

2. Normas para Publicação: o trabalho submetido à publicação deve ser inédito, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, conforme declaração a ser assinada pelos autores. Todas as opiniões e declarações contidas no trabalho são de responsabilidade exclusiva dos autores, não sendo necessariamente as mesmas do Corpo Editorial. Os trabalhos redigidos em língua portuguesa ou inglesa deverão ser enviados para o Setor de Publicações do Instituto Adolfo Lutz, em três cópias impressas, sendo uma completa e as outras duas omitindo os nomes dos autores e respectivas instituições, tanto na página de rosto como nos resumos em português e inglês. Após aprovação do trabalho, será solicitado aos autores o envio do artigo completo em cópia eletrônica acompanhado de uma cópia impressa.

3. Processo de Julgamento dos Manuscritos: os trabalhos serão aceitos para publicação após avaliação por dois pareceristas de unidades distintas daquela da origem dos autores do mesmo indicados pelo Corpo Editorial. Caso haja divergência entre seus pareceres, o artigo será encaminhado a um terceiro parecerista para decisão. A publicação de artigos está condicionada à aprovação do Corpo Editorial da Revista do Instituto Adolfo Lutz, que poderá sugerir ao autor alterações no original. Os manuscritos revisados com as cópias dos pareceres serão devolvidos aos autores para as devidas correções. Há sigilo no decorrer deste processo. O novo texto deverá retornar aos Editores que notificarão a aceitação ou a recusa do artigo. A lista de pareceristas que colaboraram em cada volume é publicada no último fascículo do ano.

4. Ética: os trabalhos de pesquisa envolvendo seres humanos deverão atender à Resolução nº 196/96 do CNS/MS e aqueles envolvendo ensaios com animais deverão atender a Lei Federal 9605 contra crimes ambientais e a Lei Federal 6638/76. No item Material e Métodos deverá constar o número do processo e o nome do Comitê que o aprovou. Os autores deverão ter em seu poder todos os documentos referentes a este procedimento, que poderão ser solicitados em qualquer momento pelos editores.

5. Conflito de Interesses: os autores ao submeterem um artigo científico a RIAL serão responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros, de interesse comercial, associativo relacionados ao material do trabalho ou outros que possam influenciá-lo, apresentando uma declaração sobre a existência ou não de tais conflitos. O autor deverá explicitar todo o apoio financeiro direto ou indiretamente recebido. Os agradecimentos às pessoas, por seu auxílio no trabalho, devem ter o seu consentimento documentado. Os pareceristas, também devem revelar aos editores qualquer conflito que possa influir ou impedir sua avaliação.

6. Ensaios Clínicos: este periódico apóia as políticas para registros de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE) em acesso aberto. Somente, serão aceitos para publicação os artigos de pesquisas clínicas que tenham recebido um número de identificação em um dos Registros de Ensaios Clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e ICMJE. O número de identificação deverá ser colocado ao final do resumo.

7. Categorias: os seguintes tipos de trabalhos serão aceitos para publicação na RIAL.

7.1. Artigo original: relato completo de pesquisa original ainda não publicada. Deve apresentar no máximo vinte páginas impressas, incluindo figuras, tabelas e referências.

7.2. Comunicação breve: é um artigo sucinto, com objetivo limitado ou cujos resultados sejam provenientes de estudos com metodologia de baixa complexidade ou rotineira, de relevância para a área de saúde pública. Deve apresentar o mesmo formato do artigo científico, contendo no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura, até quinze referências e dez páginas impressas.

7.3. Nota científica: é o relato de resultados parciais de um trabalho experimental dignos de publicação, embora insuficientes para constituírem um artigo original. Deve ser relevante e que mereça rápida divulgação. Deve apresentar no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura e até quinze referências e dez páginas impressas. O texto deve conter todos os tópicos de um artigo científico, porém na forma de texto único.

7.4. Relato de caso: contempla principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Inclui novas técnicas, terapias, diagnóstico, patologias, materiais e soluções inovadoras para problemas especiais, fenômenos anômicos e fisiológicos. Deve conter os tópicos: título e resumo

em português e inglês, introdução, relato do caso, discussão, conclusões, referências e apresentar no máximo três páginas incluindo figuras e tabelas e até dez referências.

7.5. Artigo de revisão: elaborado por especialista convidado pelo Corpo Editorial. Deve constituir uma avaliação da literatura sobre assunto cuja divulgação possa contribuir para melhorar o conhecimento da área. O Corpo Editorial aceitará sugestões que sejam relevantes à revista, sendo que neste caso deverá ser enviada uma sinopse para apreciação. A revisão deverá ser subdividida em tópicos, conter resumos em inglês e português e apresentar no máximo 15 páginas.

7.6. Resumos de teses e dissertações: serão aceitos para publicação os resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa. Deverão conter o nome do autor e seu endereço eletrônico, o nome do orientador, título da obra (em português e em inglês), nome da instituição em que foi apresentada e ano da defesa. O resumo poderá ser publicado em língua portuguesa ou inglesa, sendo de total responsabilidade do autor o seu conteúdo e também a revisão ortográfica e gramatical.

8. Preparação do manuscrito ou artigo

Geral: os textos devem ser redigidos em processador de texto Word for Windows 6.0 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. Se usar versão superior, enviar o arquivo em Rich Text Format (.rtf). Devem ser evitados arquivos compactados.

Estrutura

Página de rosto: a) título do artigo; b) nome do(s) autor(es): nome seguido do último sobrenome por extenso e em caixa alta (ex.: Ana Maria C. D. da SILVA); c) local de trabalho indicado por número sobrescrito. O autor responsável e o seu endereço deverão estar assinalados com asterisco (*) para encaminhamento da correspondência.

Resumo: deve ser redigido em português, ser claro e conciso num único parágrafo, contendo objetivo, metodologias, resultados e conclusões. Não deve exceder a 200 palavras.

Palavra-chave: podem ser utilizados até seis descritores que identifiquem o conteúdo do artigo, se possível baseados no DECS (Descritores em Ciências da Saúde), disponível no www.bireme.br terminologia em saúde e consulta ao DECS ou no *Medical Subject Headings* (MeSH), do *Index Medicus*, disponível no www.nlm.nih.gov/meshhome.html.

Introdução: deve iniciar em página nova e deve conter os objetivos da pesquisa, justificativa de sua importância, apresentação das principais variáveis, definições necessárias e discussão do problema de acordo com a literatura pertinente.

Material e Métodos: o método deve estar claramente descrito e validado, de modo a possibilitar a sua reprodução. Qualquer modificação, em métodos já publicados, deve ser devidamente explicitada.

Resultados: devem ser claros e concisos e podem apresentar tabelas e figuras quando necessárias, que devem ser auto explicativas. As figuras devem ser enviadas em arquivos separados, legendas no texto original, suficientemente claras para permitir sua reprodução (mínimo 300 dpi), fotos em arquivos (.tif).

Discussão: deve fornecer a interpretação dos resultados em função das informações apresentadas. Este item pode ser incluído em resultados, não havendo necessidade de repeti-lo em item à parte.

Conclusão: deve ser clara, concisa podendo, em alguns casos, ser incluída no item discussão não havendo a necessidade de repeti-la em item à parte.

Agradecimentos: é opcional e deve vir após a discussão/conclusão.

Title, Abstract e Key words: devem ser redigidos em inglês e seguir as recomendações apresentadas para a página de rosto, do resumo e das palavras-chave.

Referências: as referências devem ser citadas seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47 ou na página (website) <http://acponline.org/journals/resource/unifreq/htm>.

As referências devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto. Identifique as referências no texto, tabelas e legendas de ilustrações por numerais arábicos sobrescritos. As referências citadas em tabelas ou em legendas devem ser numeradas de acordo com a seqüência estabelecida pela sua primeira identificação no texto.

Segundo o Sistema Vancouver, deve-se evitar a utilização de resumos bem como as "observações inéditas" e as "comunicações pessoais" como referências, mas as comunicações escritas (não verbais) podem ser inseridas entre parênteses no texto. Os artigos aceitos para publicação, porém, ainda não publicados, podem ser incluídos na relação das referências, bastando indicar a revista e citar entre parênteses "no prelo".

Informações extraídas de manuscritos submetidos, porém ainda não aceitos, devem ser citados no texto como “observações inéditas” (entre parêntesis). Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com o Index Medicus seja pela List of Journals Indexed in Index Medicus ou no “website” <http://www.nlm.nih.gov> ou pelo Chemical Abstracts, ISI Science Citation Index, World List of Periodicals (publicado por Butterworks, Londres). Exemplos:

Artigos em revistas

Periódicos. Liste os primeiros seis autores seguidos por et al.

Telles MAS, Mosca A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima de isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Rev Inst Adolfo Lutz 2000; 59 (1/2): 15-9.

Número com suplemento

Payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. Semin Oncol 1996; 23 (1 Suppl 2): 89-97.

Volume com suplemento

Maio FD. Determinação de chumbo sanguíneo: a importância de programas interlaboratoriais na avaliação da qualidade analítica laboratorial. Rev Inst Adolfo Lutz 2002; 61 (Suppl 1): 3.

Instituição como autor

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. Med J Aust 1996; 164: 282-4.

No prelo (forthcoming)

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. No prelo 1996.

Livros e outras monografias

Indivíduo como autor

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Editor(es), compilador(es) como autor(es)

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

Instituição como autor e editor

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington (DC): The Institute; 1992.

Capítulo num livro

Franco DBGM, Landgraf M. Microorganismos patogênicos de importância em alimentos. In: Franco DBGM, Landgraf, M, editores. Microbiologia dos Alimentos 2nd ed. São Paulo: Ed Atheneu; 1996. p. 55-60.

Resumo/Trabalho de congresso publicado

DuPont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, editors. Proceedings of the 3rd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology. Houston: International Society for Experimental Hematology, 1974: 44-6.

Dissertação/Tese

Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen [Tese de doutorado]. Berkeley, California: University of California, 1965. 156pp.

Material legal

Quanto à legislação, a forma proposta por Vancouver não se aplica à realidade brasileira, para tanto recomenda-se adotar as normas a seguir:

Os elementos essenciais são: competência (país, estado ou cidade ou nome da entidade ou órgão no caso de se tratar de normas), título (especificação da legislação, número e data), ementa e título da publicação oficial, local da publicação oficial

(cidade), data (dia, mês abreviado e ano), seção e paginação. Exemplos:

Brasil. Portaria n° 695 de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 mar. 1998. Seção 1, n° 60-E, p. 5-6.

Brasil. Resolução n° 16, de 13 de dez. 1984 do Conselho Federal de Educação. Dispõe sobre reajustamento de taxas, e altera a redação do artigo 5 da Resolução n.1 de 14/1/83. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 dez. 1984. Seção 1, p. 190-1.

Associação Brasileira de Normas Técnicas [ABNT]. NBR 7024, de 1989: veículos rodoviários automotores leves: medição do consumo de combustível. Rio de Janeiro; 1990. p.29.

Conselho Nacional do Meio Ambiente [CONAMA]. Resolução n.315, de 29 out 2002: dispõe sobre as novas etapas do Programa de controle da poluição do ar

por veículos automotores (Proconve). Brasília (DF); Diário Oficial da União; 15 mar 2002.

Material Eletrônico

Artigo de revista em formato eletrônico:

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1(1):[24 screens]. Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

Monografia em formato eletrônico:

CDI, Clinical Dermatology Illustrated [monograph on CD-ROM], Reeves JRT, Maibach H. CME Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CME; 1995.

Arquivo de computador:

Hemodynamics III: the ups and downs of hemodynamics [computer program]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educacional Systems; 1993.

Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Abreviaturas: devem ser evitadas ou usadas apenas as oficiais.

Unidades de medida e seus símbolos: utilizar as legais do Sistema Internacional de Metrologia.

Tabelas: as tabelas devem ser encaminhadas em folhas separadas e designadas no texto como “Tabelas”. A sua localização aproximada deve ser indicada no texto. Serão numeradas consecutivamente, com números arábicos e encabeçadas pelos respectivos títulos, que devem ser breves e indicar claramente o conteúdo. Os dados apresentados em tabela não devem ser repetidos em gráficos.

Ilustrações (fotografias, gráficos etc.): as ilustrações devem ser encaminhadas em arquivos formato (jpg-CMYK e ou tif) (mínimo de 300 dpi) folhas separadas e designadas no texto como “Figuras”: terão numeração única e seqüencial, em algarismos arábicos e devem apresentar na sua parte inferior e fora da área de reprodução, informações breves e claras que esclareçam o conteúdo da mesma. As suas localizações aproximadas devem ser indicadas no texto. Todas as ilustrações devem ser tão claras que permitam sua reprodução com redução de 6,5 cm no sentido da largura, sem perda de nitidez ou legibilidade. Os custos das ilustrações coloridas ficarão a cargo dos autores e estarão sujeitas à confirmação. Mencionar a fonte e a permissão para reprodução das ilustrações.

Da Publicação

1. Os trabalhos destinados à publicação na RIAL deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz, Setor de Publicações, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo/SP, 01246-902, ou rial@saude.sp.gov.br a/c: Rocely Bueno.

2. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência ou endereço eletrônico. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação. Deverão ser enviados os nomes de todos os autores e afiliação completa.

3. Os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de aprovação, salvo o caso especial de comunicação breve, nota científica e relato de caso que terão prioridade.

4. A data de recebimento e a de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no mesmo.

5. As provas gráficas dos trabalhos serão enviadas aos autores para correção pelo correio eletrônico em formato.pdf (portable document format). O Corpo Editorial se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando à manutenção da homogeneidade e a qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores.

6. É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na RIAL, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, em conformidade com a legislação sobre direitos autorais.

Da Distribuição

A RIAL é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais, ou em permuta de periódicos nacionais ou estrangeiros.

INSTRUCTION FOR AUTHORS

available at <http://revista.ial.sp.gov.br>

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigos Originais/ Original Articles

- 1158 **Composição centesimal, colesterol e perfil de ácidos graxos dos peixes tainha (*Mugil cephalus*) e camurim (*Centropomus undecimalis*) da Lagoa Mundaú – AL**
Proximate composition, cholesterol and fatty acid of the fished species of estuarine tainha (*Mugil cephalus*) and camurim (*Centropomus undecimalis*) from Mundaú Lagoon – AL, Brazil
Maria Emília da Silva MENEZES, Giselda Macema LIRA, Cristhiane Maria Bazílio de OMENA, Johnnatan Duarte de FREITAS, Antônio Euzébio Goulart SANT’ANA 1-7
- 1159 **Performance of 2% and 20% glucose-containing potato agar for quantitative and qualitatively detecting molds and yeasts from non-inspected honey samples**
Performance do ágar batata contendo 2% e 20% de glicose para a detecção quantitativa e qualitativa de bolores e leveduras de amostras de mel não inspecionadas.
Fernando Melhem DALLA, Camila Diniz FONTANESI, Priscilla Anne MELVILLE, Nilson Roberti BENITES, Marcos AMAKU, Simone Carvalho BALIAN, Evelise Oliveira TELLES 8-11
- 1160 **Qualidade microbiológica da água consumida pela população do Distrito do Sana – Macaé – Rio de Janeiro**
Microbiological quality of the water consumed by the population of the District of Sana - Macaé - Rio de Janeiro
Gaspar DIAS MONTEIRO RAMOS, Hélio FERNANDES MACHADO JUNIOR, Valmir LAURENTINO SILVA, Fernanda GOMES CASTELAN, André FIORAVANTE GUERRA, Milton MARQUES FERNANDES, Arlene GASPAR 12-17
- 1161 **Influência do meio de cultura na determinação da resistência térmica de *Listeria monocytogenes* em formulações para hambúrguer**
Influence of the plating medium in the determination of thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in formulations for hamburger
Maria Helena Castro Reis PASSOS, Arnaldo Yoshiteru KUAYE 18-24
- 1162 **Qualidade microbiológica de pescado beneficiado em indústrias paraenses**
Microbiologic quality of fish processed in industries of Northern region of Brazil
Maria do Carmo Andion FARIAS, José de Arimatéia FREITAS 25-29

- 1163 **Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação**
Investigation of the antimicrobial resistance patterns in *Staphylococcus aureus* isolated in the milking of cows in the lactation
Luiz Francisco ZAFALON, Juliana Rodrigues Pozzi ARCARO, Antônio NADER FILHO, Luciano Menezes FERREIRA, Livia CASTELANI, Fabiane BENVENUTTO 30-37
- 1164 **Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás**
Occurrence of *Salmonella* sp. in carcasses of broilers slaughtered and marketed in cities state of Goiás, Brazil.
Giselle do Nascimento MOREIRA, Cíntia Silva Minafra e REZENDE, Rosângela Nunes CARVALHO, Sandra Queiroz Porto de MESQUITA, Antonio Nonato de OLIVEIRA, Marcele Louise Tadaieski ARRUDA 38-42
- 1165 **Nanoformulations of pentavalent antimony entrapped in phosphatidylserine-liposomes demonstrate highest efficacy against Experimental Visceral Leishmaniasis**
Nanoformulações de antimônio pentavalente encapsuladas em lipossomos contendo fosfatidilserina demonstram maior eficácia contra Leishmaniose Visceral experimental
André Gustavo Temppone, Heitor Franco de Andrade Jr. 43-48
- 1166 **Ocorrência de *Cryptococcus* spp e de parasitas de interesse em saúde pública, nos excretas de pombos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil**
Occurrence of *Cryptococcus* spp and parasites of interest in public health in pigeons excrement in the city of Ribeirão Preto, S. P., Brazil
Jaqueline Otero SILVA, Divani Maria CAPUANO 49-53
- 1167 ***Salmonella* sp. em corações e fígados normais e condenados de frangos de corte abatidos no estado de Goiás e identificação da suscetibilidade a antimicrobianos**
Salmonella sp. in normal and condemned heart and liver from broiler slaughtered in Goiás State and identification of susceptibility to antimicrobial agents
Cíntia Silva Minafra e REZENDE, Maria Auxiliadora ANDRADE, Albenones José de MESQUITA, Karyne Oliveira COELHO, Cibele Silva MINAFRA, Marcele Louise Tadaieski ARRUDA, Moacir Evandro LAGE 54-59
- 1168 **Citologia em meio líquido para exame de citologia cérvico-vaginal. Estudo comparativo sobre a atividade fixadora de etanol e de formaldeído**
The use of formaldehyde and ethanol as fixative agents in the liquid-based cytology technique for performing cervical cytology exams (Pap test)
Jacqueline Plewka MACHADO, Aguinaldo J. NASCIMENTO, Maria S. S. LEONART 60-66
- 1169 **Virulence-associated genes diversity in *Escherichia coli* O128 strains isolated in São Paulo, Brazil**
Diversidade dos genes associados à virulência em cepas de *Escherichia coli* O128 isoladas em São Paulo - Brasil
..... Ângela Maria Girardi DIAS, Kinue IRINO², Elena KANO, Maria Aidê Mitiko Fukushima KATO, Tânia Aparecida Tardeli GOMES, Luiz Rachid TRABULSI 67-73

Composição centesimal, colesterol e perfil de ácidos graxos dos peixes tainha (*Mugil cephalus*) e camurim (*Centropomus undecimalis*) da Lagoa Mundaú, AL/Brasil

Proximate composition, cholesterol and fatty acid of the fished species of estuarine tainha (*Mugil cephalus*) and camurim (*Centropomus undecimalis*) from Mundaú Lagoon, AL/ Brazil

RIALA6/1158

Maria Emília da Silva MENEZES^{1*}, Giselda Macema LIRA², Cristhiane Maria Bazílio de OMENA¹, Johnnatan Duarte de FREITAS¹, Antônio Euzébio Goulart SANT'ANA¹

* Endereço para correspondência: ¹Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, CEP 57072-970, Maceió, AL/Brasil, email: memenezes_2@yahoo.com.br

² Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Maceió, AL/Brasil.

Recebido: 12/05/2008 – Aceito para publicação: 29/07/2008

RESUMO

O objetivo do trabalho foi de caracterizar a composição centesimal, o teor de colesterol, o perfil de ácidos graxos e o valor calórico em filés de tainha (*Mugil cephalus* Linnaeus, 1758) e de camurim (*Centropomus undecimalis* Bloch, 1792) da Lagoa Mundaú-AL. Foram analisadas 20 amostras de cada espécie. A tainha apresentou maior percentual protéico, quando comparada com outra espécie. O teor de colesterol foi igual para ambas as espécies (188,00 mg/100g). O maior valor calórico foi detectado na tainha (105,91kcal/100g). Quanto ao perfil de ácidos graxos foram identificados 15 ácidos em ambas as espécies, sendo os principais: oléico (6,27%), linoléico (6,28%), α -linolênico (5,61%), eicosapentaenóico (5,42%) e docosahexaenóico (5,05%). A somatória do ácido eicosapentaenóico e do ácido docosahexaenóico foi maior na tainha (10,47). O estudo da composição desses peixes contribuirá na orientação dos profissionais regionais da área de saúde para oferecer adequada orientação dietética, bem como na obtenção de dados que possam ser utilizados em tabelas de composição centesimal e de ácidos graxos na fração lipídica.

Palavras-chave. composição centesimal, ácidos graxos, peixes, valor calórico, colesterol.

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the proximate composition, cholesterol contents, fatty acids profile, and caloric value in fillets of tainha (*Mugil cephalus* Linnaeus, 1758) and of camurim (*Centropomus undecimalis* Bloch, 1792) from the Mundaú Lagoon-AL, Brazil. Twenty samples of each fish species have been analyzed. Tainha presented higher proteins percentile, when compared with other fish species. The cholesterol contents was equal in both species (188.00 mg/100g). The highest caloric value was detected in tainha (105.91kcal/100g). As for the fatty acids profile, 15 acids have been identified in both species, mainly: oleic acid (6.27%), linoleic (6.28%), α -linolenic (5.61%), eicosapentaenoic (5.42%) and docosahexaenoic acid (5.05%). The sum of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid was highest in tainha (10.47). The observed data will be useful in estimating the rate of nutrients consumption in dietary investigations. The study on the composition of these fishes will also assist the regional health professionals for advising an adequate dietary guidance, as well as in obtaining data which can be used in tables for proximate composition and for fatty acids profile in the lipid fraction.

Key words. proximate composition, fatty acids, fishes, caloric value, cholesterol.

INTRODUÇÃO

Os peixes são um importante constituinte da dieta humana de inúmeros grupos populacionais, já que representam uma fonte de diversos componentes com significativo valor nutricional, como os protídios, além de serem a maior reserva de ácidos graxos poliinsaturados, especialmente o eicosapentaenóico (20:5n-3, EPA) e o docosaheptaenóico (22:7n-3, DHA), da série ômega-3, aos quais são atribuídos numerosos benefícios cardioprotetores¹.

Os ácidos graxos poliinsaturados têm grande importância biológica, visto que participa da estrutura e integridade das membranas e de processos vitais, como a síntese dos eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos). Além disso, esses ácidos graxos contribuem para a redução do risco de doenças coronárias, reumáticas, diabetes e câncer. Os ácidos linoléico (18:2n-6, LA) e α -linolênico (18:3n-3, LNA) são dois representantes das séries n-6 e n-3, que são absolutamente essenciais na dieta humana².

A natureza e proporção dos ácidos graxos na dieta também influenciam na concentração do colesterol sérico, sendo que os ácidos graxos saturados tendem a elevá-lo, enquanto os ácidos graxos poliinsaturados promovem sua diminuição³. As pesquisas nutricionais e epidemiológicas revelam que a proporção entre ácidos graxos poliinsaturados n-6 e n-3 na dieta é tão importante para as funções fisiológicas e prevenção de doenças quanto a proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados³.

Dois dos mais importantes ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de cadeia longa (LC-PUFAs) (superior a 18 carbonos), naturalmente presentes em produtos de origem marinha, são o EPA e o DHA³. No que diz respeito ao tipo e teor de ácidos graxos presentes nos peixes, as diferenças são influenciadas pelas características genéticas, habitat, qualidade e quantidade de alimentos disponíveis (fitoplâncton e zooplâncton)⁴.

Do complexo estuarino-lagunar Lagoa Mundaú situada no Estado de Alagoas, entre as coordenadas 9° 35' 00" – 9° 37' 00"S e 35° 42' 30" – 35° 37' 30" W, banhando os municípios de Maceió, Santa Luzia do Norte, Coqueiro Seco, Pilar e Marechal Deodoro, depende a sobrevivência de muitas comunidades populacionais autóctones ribeirinhas e também a existência de uma culinária alagoana típica⁵. Os pratos à base de peixe e marisco não somente fazem parte da dieta da população litorânea como também são muito apreciados pelos turistas.

O estudo detalhado da composição nutricional destes peixes regionais através de técnicas analíticas disponíveis, contribuirá com os profissionais da área de saúde para uma adequada orientação dietética, bem como na obtenção de dados que possam ser utilizados em tabelas de composição centesimal e de ácidos graxos de suas frações lipídicas. Tendo em vista a importância alimentar e a carência de informações sobre o valor nutritivo desses peixes regionais, procedeu-se o estudo da composição centesimal, teor de colesterol, perfil de ácidos graxos e valor calórico dos filés destas espécies de peixes estuarinos,

dentre os mais comercializados no estado de Alagoas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram analisadas 40 amostras de filés de peixes *in natura* de duas espécies de peixes mais comercializadas da Lagoa Mundaú-AL, segundo IBAMA⁶ sendo: 20 amostras de tainha (*Mugil cephalus* Linnaeus, 1758) e 20 amostras de camurim (*Centropomus undecimalis* Bloch, 1792). Foram escolhidos peixes de aproximadamente 500g procedentes da Lagoa Mundaú-AL e coletados nos seguintes períodos: a tainha em março de 2004 e o camurim em junho de 2004. As amostras pesando aproximadamente 250g de filé sem pele e sem espinha foram trituradas em processador até a formação de massa homogênea. Assim preparadas, foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno, identificadas e congeladas a - 17°C até o momento da realização das análises. As amostras foram conduzidas ao Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas, onde as análises foram realizadas.

Determinação da composição centesimal

Após homogeneização, realizaram-se as seguintes determinações em triplicata:

Umidade: determinada pela perda de peso em estufa regulada a 105°C, segundo AOAC⁷.

Cinzas: obtidas por incineração de uma quantidade conhecida da amostra, em mufla a 550°C, até obtenção de peso constante⁷.

Proteínas: determinadas pelo método Kjeldhal, que consiste na determinação do nitrogênio total. Para converter o resultado em proteína bruta foi utilizado o fator 6,25⁷.

Lipídeos totais: extraídos a frio pelo método de Folch et al.⁸, utilizando 2 extrações com clorofórmio:metanol (2:1), lavagem do resíduo (clorofórmio:metanol – 2:1), adição de KCl 0,88% em H₂O, separação das fases, adição de metanol: H₂O (1:1), evaporação de clorofórmio em rota-evaporador, fração lipídica ressuspendida em clorofórmio. Alíquotas foram tomadas para determinações gravimétricas.

Os carboidratos (fração Nifext) foram determinados por diferença.

O valor calórico total foi calculado a partir dos coeficientes calóricos correspondentes para proteínas e lipídeos, respectivamente, 4 e 9kcal/g⁹.

Colesterol

Uma alíquota de 5ml do extrato lipídico obtido pelo método de Folch foi tomada para análise, segundo o procedimento de Bohac et al.¹⁰ adaptado por Bragagnolo; Rodriguez-Amaya¹¹, através de saponificação, extração da

matéria insaponificável, reação de cor, leitura da absorbância em espectrofotômetro a 490nm, contra um branco. As absorbâncias obtidas foram comparadas às da curva padrão utilizada¹².

Perfil de Ácidos Graxos

Os lipídeos totais foram esterificados segundo Hartman e Lago¹³. Os metil ésteres foram analisados no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, utilizando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectroscopia de massa utilizando-se um cromatógrafo modelo GC-17 A (Shimadzu, Tóquio, Japão), equipado com detector de ionização de chama, injetor split na razão de 1:50 e coluna capilar D-1 (30m; 0,25mm; 0,25µm). O espectrômetro de massas utilizado foi Shimadzu com energia do feixe eletrônico de 70eV. As condições cromatográficas foram as seguintes: gás de arraste – hélio com fluxo de 1mL/min; a temperatura inicial da coluna foi 150°C por 5 minutos, com aquecimento até 240°C a uma taxa de 2°C/min; a temperatura do injetor foi de 220°C e a do detector de 245°C. As amostras foram injetadas manualmente em triplicata e o volume de injeção foi de 1µL. O tempo de análise cromatográfica foi de 70 minutos. Para a identificação dos ácidos graxos foram utilizados padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos puros, comparando-se o tempo de retenção dos ésteres metílicos das amostras e dos padrões. A quantificação dos ácidos graxos foi feita por normalização de área.

Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Epi-info, versão 2002. Para testar a homogeneidade da variância foi aplicada a análise de variância (ANOVA), sendo que para variâncias não homogêneas foram aplicados o teste χ^2 de Barlett's e o teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância estabelecido para todos os testes foi $p=0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição centesimal

Na Tabela 1 encontram-se os dados relativos à composição centesimal dos filés dos peixes tainha e camurim. A segunda espécie foi a que apresentou maior teor de umidade (79,62%). Segundo Hiane et al.¹⁴ a piranha (*P. nattereri*) do Pantanal do Mato Grosso do Sul apresentou teor de umidade equivalente ao da tainha (78,4%), enquanto que a piraputanga (*B. orbignyana*), oriunda da mesma região, apresentou umidade menor 72,9%. Valores inferiores aos encontrados neste trabalho foram relatados por Freitas et al.¹⁵ para o pacu (*Piractus mesopotamicus*; 70,5%), curimatá (*Prochilodus scrofa*; 73,4%), tilápia (*Oreochromis niloticus*; 77,1%) e tambaqui (*Colossoma macropomun*; 76,8%) encontrados nos rios do Ceará. Dados semelhantes foram observados por Oliveira¹⁶ com o mandim (*Arius spixii*) espécie da mesma lagoa (70,1%).

O conteúdo protéico da tainha foi maior que o do camurim, em base úmida. Teor protéico equivalente a 18,2%, em base úmida, foi obtido para a tilápia por Siqueira¹⁷, percentual equivalente ao do camurim relatado no presente trabalho. Valor inferior foi relatado por Oliveira¹⁶ para o mandim (*Arius spixii*) espécie do mesmo habitat dos peixes estudados neste trabalho (15,30%).

Segundo Kirk e Sawyer¹⁸, quando o método de Kjeldhal é empregado, a composição centesimal total pode ultrapassar os 100%, devido a multiplicação do nitrogênio por 6,25, o que foi observado no presente trabalho.

No que diz respeito aos lipídeos totais, tainha e camurim apresentaram teores semelhantes (2,5% em base úmida). O conteúdo de lipídeos dos peixes de água doce varia muito, conforme foi evidenciado em inúmeros estudos. Segundo Henderson e Tocher¹⁹, após a análise de 56 filés de peixes de água doce de clima temperado, relataram uma variação de 0,7% a 25,8% de base úmida. Oliveira¹⁶ encontrou teor de lipídeo elevado em mandim (*Arius spixii*) (8,67%). Baixo teor de lipídeos

Tabela 1. Composição centesimal, valor calórico e teor de colesterol de peixes da Lagoa Mundaú, AL.

Composição	Tainha (<i>Mugil cephalus</i>)		Camurim (<i>Centropomus undecimalis</i>)	
	Base úmida*	Base seca**	Base úmida*	Base seca**
Umidade (g/100g)	78,40 ± 1,65	-	79,62 ± 1,07	-
Proteínas (g/100g)	20,85 ± 1,61	97,03 ± 10,27 ^a	18,29 ± 1,16	88,94 ± 7,64 ^b
Lipídeos (g/100g)	2,5 ± 0	11,62 ± 0,86 ^a	2,5 ± 0	12,53 ± 1,02 ^b
Cinzas (g/100g)	1,06 ± 0,13	4,94 ± 0,55 ^a	1,09 ± 0,15	5,40 ± 0,75 ^b
Valor calórico (kcal/100g)	105,91	-	95,66	-
Colesterol (mg/100g)	188,00 ± 3,98	876,42 ± 26,56 ^a	187,52 ± 3,85	922,37 ± 17,72 ^b

* Média ± desvio padrão de 20 amostras analisadas em triplicata. ** Médias obtidas através de cálculo. Numa mesma linha, os valores que apresentarem letras minúsculas sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

totais (1,4%) foi relatado para o tambaqui, outro peixe de rios brasileiros¹⁵. Assim, comparando-se com os dados disponíveis para peixes de água doce, pode-se afirmar que a tainha e o camurim apresentaram quantidade relativamente baixa de lipídeos totais.

Com relação às cinzas, as espécies estudadas apresentaram valores similares em base úmida, porém significativamente diferentes ($p < 0,05$) em base seca (Tabela 1). Oliveira¹⁶ estudando mandim (*Arius spixii*) encontrou valor superior ao das espécies estudadas (4,84%). Morais e Campos²⁰ afirmaram que o teor de cinzas em peixes magros está na faixa de 0,5% a 1,5%.

A tainha apresentou maior valor calórico (105,91kcal/100g) que o camurim (95,66kcal/100g), ambas as espécies tiveram valores inferiores ao encontrado por Oliveira¹⁶ para o mandim (*Arius spixii*) (144,79kcal/100g). Em nenhuma das duas espécies o cálculo da fração Nifext indicou a presença de carboidratos.

Segundo Stansby²¹ os resultados obtidos permitiram classificar o camurim na categoria A de peixes (gordura < 5,0%; proteína = 15,0 a 20,0%), enquanto que a tainha foi classificada na categoria D (gordura < 5,0%; proteína > 20,0%). Portanto, sob o ponto de vista nutricional, o valor dessas espécies é excepcional, visto que podem ser utilizadas na elaboração de dietas para pacientes obesos, diabéticos e que apresentem doenças crônicas, como câncer e problemas cardiovasculares.

Colesterol

Em termos de base úmida, os teores de colesterol presentes na tainha e no camurim foram semelhantes; no entanto, em base seca verificam-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as espécies, tendo a tainha apresentando menores teores (Tabela 1). Em peixes de água doce (bagre, corvina, curimatá e pintado) são citados valores de colesterol inferiores aos encontrados neste estudo, que variaram entre 40,0 e 121,0mg/100g de matéria úmida^{22,23}. Estudos conduzidos com peixes da região pantaneira (dourado, piranha, pacu, piraputanga, piaçu e pintado) foram relatados também teores de colesterol inferiores aos dos peixes da Lagoa Mundaú: a variação foi de 51,5mg/100g (dourado) a 107,04mg/100g (pintado)¹⁴. Oliveira¹⁶ estudando o mandim (*Arius spixii*) também detectou teor inferior ao encontrado neste estudo (82,66 mg/100g).

Um fato interessante que merece ser mencionado é a variação discrepante entre os teores de colesterol da tilápia e do curimatá no verão e no inverno²⁴. A autora observou que o colesterol da tilápia aumentou de 66,79mg/100g no verão para 71,37mg/100g no inverno, enquanto que o do curimatá diminuiu de 92,03mg/100g no verão para 73,39mg/100g no inverno.

Embora os filés dos peixes do *habitat* estuarino sejam mais ricos em colesterol que os demais, eles ainda se enquadram dentro do limite máximo recomendado pela Sociedade Brasileira de Cardiologia²⁵, que sugere uma ingestão de colesterol total abaixo de 300mg diárias, supondo ingestão de 100g destes peixes por dia.

Ácidos graxos

A Tabela 2 apresenta a porcentagem relativa e as proporções desses ácidos graxos. Em ordem decrescente, os ácidos graxos saturados mais abundantes no camurim foram o pentadecanóico (20,33%), palmítico (14,38%) e esteárico (11,93%), enquanto que na tainha foram os ácidos graxos: palmítico (12,97%), pentadecanóico (9,14%) e margárico (9,13%). Oliveira¹⁶ também detectou teor de ácido graxo palmítico elevado para o mandim (*Arius spixii*) (41,19%) dado este também detectado neste estudo.

Essas quantidades são aproximadamente duas vezes maiores que aquelas encontradas nas espécies da Lagoa Mundaú. Nova et al.²⁶ também relataram teor elevado de ácido palmítico na tilápia (22,0%). Acredita-se que esse ácido graxo seja um dos principais responsáveis pelo aumento do colesterol sérico²⁷, visto que a concentração deste esteróide dobra quando o consumo de ácidos graxos saturados é maior que o de ácidos graxos poliinsaturados²⁸. Isto evidencia, portanto, que os peixes tainha e camurim apresentaram vantagens em relação às espécies de água doce mencionadas e também com relação a espécie de peixe do mesmo *habitat* do estudo.

A concentração do ácido esteárico foi aproximadamente três vezes maior no camurim (11,93%) que na tainha (4,26%), o que constitui um aspecto positivo, sob o ponto de vista nutricional do camurim, pois este ácido graxo é muito importante para a síntese de ácidos graxos insaturados. Teores menores que o do camurim foram detectados no curimatá, tilápia, pacu e tambaqui, os quais variaram entre 5,2% e 9,8%²⁶. Oliveira¹⁶ encontrou teor superior no mandim (*Arius spixii*) (10,40%).

Com relação ao ácido mirístico, as concentrações foram semelhantes para ambos os peixes da Lagoa Mundaú, isto é, 7,09% no camurim e 7,66% na tainha. Esse valor foi maior que aquele encontrado em outros peixes de água doce, como o pacu (3,2%), curimatá (4,3%) e tilápia (4,1%)²⁶. Assim como, o detectado por Oliveira¹⁶ para mandim (*Arius spixii*) (2,30%).

Os ácidos graxos monoinsaturados foram mais abundantes na tainha (20,01%) do que no camurim (17,45%), particularmente o palmitoléico e oléico, sendo esse último considerado importante sob o ponto de vista nutricional devido aos seus efeitos benéficos citados na revisão de Lira et al.²⁷. Em alguns peixes de água doce, os teores de ácido oléico podem chegar a 41,0%, como é o caso do pacu e 40,1%, citado no tambaqui, enquanto que o teor de ácido palmitoléico pode superar os 16,0%, como exemplificado pelo curimatá²⁹. Os ácidos graxos monoinsaturados têm efeito hipocolesterolêmico intermediário³⁰.

A tainha apresentou vantagens sobre o camurim também no que diz respeito aos percentuais totais de ácidos graxos poliinsaturados. Os peixes da Lagoa Mundaú apresentaram teores mais elevados de ácidos graxos poliinsaturados que o curimatá, pacu, tilápia e tambaqui, estudados por Maia²⁹, em que o conteúdo de poliinsaturados variou entre 2,5% e 13,4%. Isso significa que a tainha e o camurim são fontes excelentes desses ácidos graxos, cuja deficiência acarreta problemas dermatológicos, no crescimento e nas funções reprodutivas²⁸.

No caso dos ácidos da família n-3 e n-6, os teores encontrados na tainha foram superiores aos do camurim. Segundo Moreira et al.³¹ os ácidos graxos linoléico e α -linolênico são essenciais para funções celulares normais, e atuam como precursores para a síntese de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa como os ácidos araquidônico, eicosapentaenóico e docosaheptaenóico, que fazem parte de numerosas funções celulares como a integridade e fluidez das membranas, atividade das enzimas de membrana, interações lipídeo-proteína e síntese de eicosanóides. O teor de ácido α -linolênico, por exemplo, foi 2,5 vezes maior na tainha que no camurim e 1,5 vezes maior do que aquele registrado por Maia²⁹ para o curimatá (3,7%). Oliveira¹⁶ detectou teor inferior para mandim (*Arius spixii*) (2,09%) em relação ao da tainha. Já em relação ao ácido graxo linoléico da família n-6, a tainha apresentou teor superior ao camurim.

Os teores dos ácidos graxos EPA e DHA também foram

superiores na tainha, sendo que no caso do DHA, a diferença foi cerca de 5 vezes maior. Os peixes curimatá e tilápia apresentaram teores de EPA (1,33%) e DHA (2,21%) inferiores aos dos peixes da Lagoa Mundaú^{26,29}. Oliveira¹⁶ encontrou teores menores para os ácidos graxos EPA e DHA em mandim (*Arius spixii*) 1,57% e 3,87% respectivamente. As espécies de água doce, particularmente de águas tropicais, têm quantidade de EPA e DHA significativamente menores do que as espécies marinhas^{32,33}.

O somatório de EPA e DHA das espécies do *habitat* estuarino foi de 10,47% para tainha. Oliveira¹⁶ estudando o mandim (*Arius spixii*) encontrou 5,44% para o somatório de EPA e DHA. Estes ácidos graxos poliinsaturados atuam como reguladores da ação do ácido araquidônico, que pode causar inflamação, quando seus metabólitos são produzidos em excesso. Esses ácidos aumentam a remoção das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) do plasma¹⁵.

Tabela 2. Porcentagem dos ácidos graxos presentes nos peixes da Lagoa Mundaú, AL.

Tipo de ácido graxo	Tainha* (<i>Mugil cephalus</i>)%	Camurim* (<i>Centropomus undecimalis</i>)%
A. Saturados		
Láurico (C12:0)	6,61 ± 1,38 ^a	2,11 ± 0,35 ^b
Mirístico (C14:0)	7,66 ± 1,50 ^a	7,09 ± 3,85 ^a
Pentadecanóico (C15:0)	9,14 ± 1,20 ^a	20,33 ± 6,91 ^b
Palmítico (C16:0)	12,97 ± 4,28 ^a	14,38 ± 1,06 ^b
Margárico (C17:0)	9,13 ± 3,12 ^a	9,87 ± 2,59 ^a
Esteárico (C18:0)	4,26 ± 1,72 ^a	11,93 ± 4,88 ^b
Total	49,77	65,71
B. Monoinsaturados		
Palmitoléico (C16:1)	7,60 ± 1,69 ^a	4,79 ± 1,83 ^b
Heptadecenóico (C17:1 n-7)	6,14 ± 1,84 ^a	7,78 ± 1,06 ^b
Oléico (C18:1 n-9)	6,27 ± 1,31 ^a	4,88 ± 1,97 ^b
Total	20,01	17,45
C. Poliinsaturados		
Linoléico (C18:2 n-6)	6,28 ± 1,37 ^a	4,08 ± 0,26 ^b
α -Linolênico (C18:3 n-3)	5,61 ± 2,96 ^a	2,20 ± 0,84 ^b
Araquidônico (C20:4 n-6)	2,97 ± 0,88 ^a	1,78 ± 0,79 ^a
Eicosapentaenóico – EPA (C20:5 n-3)	5,42 ± 2,10 ^a	4,28 ± 1,70 ^b
Docosapentaenóico (C22:5 n-3)	4,79 ± 1,55 ^a	4,61 ± 1,05 ^b
Docosaheptaenóico – DHA (C22:6 n-3)	5,05 ± 1,57 ^a	0,93 ± 0,23 ^b
Total	30,12	17,88
D. Razões e somatórios		
Razão Insaturados/Saturados	1,00	0,53
Razão Monoinsaturados/Saturados	0,40	0,26
Proporção n-6:n-3	1:2	1:2
Somatório EPA + DHA	10,47	5,21
Razão Hipercoeristêmicos/Hipocoeristêmicos**	0,41	0,60

* Média de 10 amostras analisadas em duplicata. ** A razão Hipercoeristêmicos/Hipocoeristêmicos foi calculada dividindo-se o somatório dos ácidos C14:0 e C16:0 (hipercoeristêmicos) pelo somatório dos ácidos monoinsaturados e poliinsaturados (hipocoeristêmicos). Numa mesma linha, os valores com letras minúsculas sobrescritas distintas são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O ácido araquidônico, um dos ácidos da família n-6 essenciais às funções fisiológicas, foi detectado em concentrações mais elevadas na tainha (2,97%) do que no camurim (1,78%), porém não significativamente diferentes ($p < 0,05$), assim como em outros peixes de água doce, como tilápia e curimatá 2,5% e 2,6%, respectivamente²⁹. Teor de ácido araquidônico mais elevado que os relatados neste estudo são citados por Nova et al.²⁶, em tilápia (3,21%).

A presença dos ácidos graxos poliinsaturados é particularmente importante na dieta das mulheres grávidas e em fase de amamentação, pois os ácidos araquidônico e DHA são componentes estruturais predominantes da substância cinzenta do cérebro e da retina e, dessa forma, devem ser disponibilizados ao feto (através do tecido placentário) e ao recém-nascido (através do leite)³⁴.

Entretanto, os efeitos benéficos dos ácidos graxos essenciais não dependem apenas das suas quantidades absolutas e da proporção entre poliinsaturados/saturados, mas também da proporção n-6:n-3 existentes nos fosfolípidos de membranas. Alguns autores consideram que na proporção n-6:n-3 o ideal deve ser 10:1 ou 11:1³⁴, enquanto que a Organização Mundial da Saúde³⁵ recomenda proporções de 3:1 ou 4:1. No presente trabalho, a razão n-6:n-3 nas espécies estuarinas estudadas foram de 1:2. Oliveira¹⁶ em seu estudo com mandim (*Arius spixii*) detectou 0,71:1 para a razão n-6:n-3.

Os resultados obtidos neste trabalho apontam vantagens no consumo da tainha sob o ponto de vista nutricional devido ao seu valor biológico e por ser uma fonte de EPA e DHA.

CONCLUSÃO

Tendo como base os resultados obtidos, e nas condições em que o trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

A tainha apresentou teores mais elevados de proteínas, cinzas, calorias e baixos teores de lipídeos quando comparada a outras espécies.

Os teores de colesterol para ambas as espécies estão abaixo do limite recomendado de 300mg/dia para dieta humana.

Os principais ácidos graxos encontrados para a tainha foram: saturados (palmítico e pentadecanóico), monoinsaturados (palmitoléico e oléico) e ácidos graxos poliinsaturados da família n-6 (linoléico) e n-3 (α -linolênico, EPA e DHA). A espécie apresenta-se como fonte de ácidos graxos hipocolesterolêmicos e a razão encontrada entre os ácidos graxos n-6:n-3 estão dentro dos padrões recomendados. Para o camurim os ácidos graxos de importância foram: saturados (pentadecanóico, palmítico e esteárico), monoinsaturados (heptadecanóico e oléico) e os poliinsaturados foram detectados em teores inferiores ao da tainha.

Os dados contidos neste estudo são muito importantes no ponto de vista nutricional e econômico e poderão contribuir para difundir o consumo de tainha para adultos, gestantes e crianças devido ao seu valor biológico e a presença de EPA e

DHA. Esperamos que estes resultados contribuam para bancos de dados que auxiliarão na melhor estimativa de consumo de nutrientes em inquéritos dietéticos.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e ao (PIBIC/CNPq/UFAL) pela bolsa concedida a uma das autoras. Nossos agradecimentos se estendem aos professores José Madalena Silva e Paulo Vanderlei Ferreira pelo auxílio com as análises estatísticas.

REFERÊNCIAS

1. Badolato ESG, Carvalho JB, Amaral Mello MRP, Tavares M, Campos NC, Aued-Pimentel S, Morais C. Composição centesimal, de ácidos graxos e valor calórico de cinco espécies de peixes marinhos nas diferentes estações do ano. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1994; 54(1): 27-35.
2. Roos NM, Siebelink E, Botts ML, Van Tol A, Schouten EG, Katan MB. Trans monounsaturated fatty acids and saturated fatty acids have similar effects on postprandial flow-mediated vasodilation. *Eur J Clin Nutr Basingstoke*. 2002;56(7):674-9.
3. Lima MF, Henriques CA, Santos FD, Andradre PMM, Tavares do Carmo MG. Ácido graxo ômega 3 docosahexaenóico (DHA:C22:6 n-3) e desenvolvimento neonatal: aspectos relacionados à sua essencialidade e suplementação. *Nutrire: Rev Soc Bras Alim Nutr = J Brazilian Soc Food Nutr*. 2004; 28: 65-77 .
4. Stansby ME. Nutricional properties of fish oils. *World Rev Nutr Diet*. 1969;11:46-105.
5. Sousa EC, Calado TCS. Variação sazonal e proporção sexual da fauna de camarões da região estuarina do Complexo Estuarino-Lagunar Mundaú/Manguaba, Alagoas. *Bolm Estud Ciênc Mar*. 1998; 10: 65-81.
6. Boletim Estatístico da Pesca Marítima e Estuarina do Nordeste do Brasil 2000. (IBAMA, 2001). Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Nordeste - 2001 - Tamandaré, PE:CEPENE.
7. AOAC – Association of official analytical chemists. Horwitz, Washington. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. 17 ed. Arlington: AOAC Inc., 2000; (1/2).
8. Folch J, Lees, M, Sloane Stanley, GH. A simple method for the isolation and purification of total lipide from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226: 497-509.
9. Brasil. Leis, Decretos, etc. Portaria nº33 de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília - DF, 30 mar. 1998. Seção I, nº 60-E, p. 5-6. Adota os valores constantes das tabelas do anexo desta portaria como níveis de IDR (Ingestão Diária Recomendada) para as vitaminas, minerais e proteínas.*
10. Bohac, CE, Rhee, KS, Cross, HR, Ono, K. Assesment of methodologies for colorimetric cholesterol assay of meats. *J Food Sci*. 1988; 53: 1642-4.
11. Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya DB. Teores de colesterol em carne suína e bovina e efeito do cozimento. *Ciênc Tecnol Alimen*. 1995; 15:(1)11-7.
12. Searcy RL, Bergquist LMA. New color reaction for the quantitation of serum cholesterol. *Clin Chimica Acta*.1960; 5: 192-9.
13. Hartman L, Lago BCA. Rapid preparation of fatty methyl esters from lipids. *Lab Pract*.1973; 22: 475-7.
14. Hiane PA, Filho AFL, Filho MMR, Ramos MIL. Teores de colesterol e lipídeos totais em seis espécies de peixes capturados na região pantaneira do estado do Mato Grosso do Sul. *B.CEPPA*. 2002; 20(1): 65-74.

15. Freitas AS, Borges JTS, Costa RQ, Cornejo FEP, Wilberg, VC. Teores de lipídeos totais, ácidos graxos e colesterol em resíduos desidratados de camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri* HELLER, 1862) capturado no estado do Rio de Janeiro. B.CEPPA. 2002;20 (2): 355-62.
16. Oliveira FR. Avaliação do valor nutricional e ocorrência de óxidos de colesterol em peixe Mandim (*Arius Spixii*) comercializado em Maceió-AL [Dissertação de Mestrado]. Maceió, Alagoas: Universidade Federal de Alagoas - Faculdade, 2007. 50 pp.
17. Siqueira AAZC. Efeito da irradiação e refrigeração na qualidade e no valor nutritivo da tilápia (*Oreochromis niloticus*) [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba, São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001. 137 pp.
18. Kirk RS, Sawyer R. Pearson's composition and analysis of foods. 9th, ed. Harlow Essex, Longman; 1981; 504-18.
19. Henderson RJ, Tocher DR. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Lipid Res.*1987; 26: 281-347.
20. Morais C, Campos SDS. Carne de pescado separada mecanicamente da ictiofauna acompanhante da captura de camarão-sete-barbas: obtenção e utilização de bloco congelado. *Colet ITAL.*1993; 23(1): 56-67.
21. Stansby ME. Polysaturates and fat in fish flesh. *J Am Diet Ass.*1973, 63: 625-30.
22. Franco G. Tabela de composição química dos alimentos. 9. edição. Rio de Janeiro: Atheneu, 1998. 307p.
23. NEPA-Tabela de Composição de Alimentos-TACO-UNICAMP. 2004. Material disponível em <http://www.unicamp.br/nepa/taco> . Acesso em 17/07/2005.
24. Luzia LA et al. The Influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of brazilian fish. *Food Chem.* 2003; 15:1-5.
25. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol.*2004;82, (suplemento IV).
26. Nova CMVMV, Godoy HT, Aldrigue ML. Composição de ácidos graxos dos lipídeos totais de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pargo (*Lutjanus purpureus*). In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, XVII, Fortaleza, 2000, v.4, p.45.
27. Lira GM, Mancini Filho J, Torres RP, Oliveira AC, Vasconcelos AMA, Omena CMB, Almeida MCS. Composição centesimal, valor calórico, teor de colesterol e perfil de ácidos graxos da carne de búfalo (*Bubalis bubalis*) da cidade de São Luiz do Quitunde-AL. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2005; 64(1): 31-8.
28. Sabarense CM. Avaliação do efeito dos ácidos graxos *trans* sobre o perfil dos lipídeos teciduais de ratos que consumiram diferentes teores de ácidos graxos essenciais [Tese de Doutorado]. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2003. 130 pp.
29. Maia EL. Otimização da metodologia para caracterização de constituintes lipídicos e determinação da composição em ácidos graxos e aminoácidos de peixes de água doce [Tese de Doutorado]. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 1992. 242 pp.
30. Kris-Etherton P, Yu S. Individual fatty acids effects on plasma lipids and lipoproteins; human studies. *Am J Clin Nutr.*1977; Suppl.1628-44.
31. Moreira NX, Curi R, Mancini Filho J. Ácidos graxos: uma revisão. *Nutrire; rev. Soc BrasAlim Nutr= J Brazilian Soc Food Nutr.* 2002; 24:105-23.
32. Maia EL, Rodriguez-Amaya DB, Franco MB. Fatty Acids of the Total, Neutral and Phospholipids of the Brazilian Fish (*Prochilodus scrofa*). *J Food Composit Anal.*1994; 7: 240-51.
33. Maia EL, Rodriguez-Amaya DB, Hotta LK. Fatty acid composition of the total, neutral and phospholipids of pond-raised Brazilian (*Piractus mesopotamicus*). *J Food Sci Technol.*1995; 30: 592-7.
34. Simopoulos AP. Summary of the nato advanced research workshop on dietary w-3 and w-6 fatty acids: biological effects and nutritional essentiality. *Am Inst Nutrition.* 1991;22: 521-6.
35. FAO/WHO. Report of a joint expert consultation: fats and oils in human nutrition. *Food and Nutri. Paper, Rome, 1994; v.57, n.1; 49-55.*

Performance of 2% and 20% glucose-containing potato agar for quantitative and qualitatively detecting molds and yeasts from non-inspected honey samples

Performance do ágar batata contendo 2% e 20% de glicose para a detecção quantitativa e qualitativa de bolores e leveduras de amostras de mel não inspecionadas

RIALA6/1159

Fernando Melhem DALLA¹, Camila Diniz FONTANESI¹, Priscilla Anne MELVILLE¹, Nilson Roberti BENITES¹, Marcos AMAKU¹, Simone Carvalho BALIAN¹, Evelise Oliveira TELLES^{1*}

* Endereço para correspondência: ¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Av. Prof Dr. Orlando Marques de Paiva, 87. Cidade Universitária. CEP 05508-270. São Paulo, SP/Brazil, e-mail: bufalo@usp.br

Recebido: 10/03/2008 – Aceito para publicação: 12/06/2008

ABSTRACT

The Brazilian Official Methodology had established the employment of two culture media for determining molds and yeasts in honey samples, being one containing 2% glucose and other 20%. From 2003 onward, it has been established the use of 2% glucose-containing medium only for this purpose. Variation in glucose concentration into culture media may induce interference on osmotic pressure, which may cause difference on fungi identification and counting results. In this study, 30 samples of honey informally traded in the city of São Paulo were analyzed for determining the occurrence of molds and yeasts through spread plate on potato agar media containing 2% and 20% of glucose. No significant difference in fungi counting (CFU.g⁻¹) was found when the cultures in both media were compared, although higher numbers of molds (CFU.g⁻¹), mainly *Penicillium* spp, were observed in 2% medium. The 20% glucose-containing medium showed the best performance in detecting yeasts (CFU.g⁻¹). In view of the honey be considered as an adverse environment for mycotoxigenesis, although susceptible to yeast fermentation, the 20% glucose medium should be chosen for performing the honey microbiological quality analyses.

Key words. honey, osmotic pressure, culture medium, yeasts, molds, fungi.

RESUMO

Até o ano de 2003, a Metodologia Oficial Brasileira determinava o uso de dois meios de cultura para executar a análise de bolores e leveduras, um contendo 2% e outro com 20% de glicose; atualmente, recomenda-se apenas o de 2%. Concentrações distintas de glicose implicam em pressões osmóticas diferentes, o que pode influenciar no resultado da quantificação e da identificação dos fungos. No presente trabalho, 30 amostras de mel comercializadas informalmente na cidade de São Paulo foram analisadas visando o isolamento de bolores e leveduras por meio de semeadura em superfície em ágar batata contendo 2% e 20% de glicose. Não houve diferença estatística significante entre as contagens de fungos (CFU.g⁻¹) nos dois tipos de meios, embora tenham sido observados números maiores de bolores (CFU.g⁻¹), especialmente *Penicillium* spp nas amostras cultivados em meio contendo 2% de glicose. O meio com 20% de glicose apresentou melhor desempenho para detectar leveduras (CFU.g⁻¹). Considerando que o mel é um ambiente muito adverso para a micotoxigenese, mas passível de fermentação pelas leveduras, pode-se inferir que o meio com 20% de glicose seja a melhor alternativa para avaliar a qualidade microbiológica desse produto.

Palavras-chave. mel, pressão osmótica, meio de cultura, leveduras, bolores, fungos.

INTRODUCTION

Honey is a very hostile environment to microbial metabolism due to its high acidity, low water activity and low humidity. Brazilian Official Standards for honey allows a maximum of 20% humidity, demands the absence of fermentation signs and the pH between 3.3 and 4.6^{1,2}. The water activity in the honey varies from 0.54 and 0.75^{3,4}. In such conditions the fungi are the most viable microorganisms, especially the xerophilic yeasts and the osmophilic molds.

Both yeasts and molds can spoil the honey. Yeasts can cause fermentation and molds grow on the surface causing a repugnant aspect³. From the public health point of view, neither yeasts nor molds represent hazards. Yeasts are not implicated in food poisoning and the micotoxin production by molds in honey can be considered unlikely due to the fact that products with low water activity and poor in starch do not favour the micotoxigenesis⁵.

In the past, two media (with 2% and 20% of glucose) were required by Brazilian official methodology⁶ for honey analysis but currently just the medium with 2% of glucose is demanded⁷. Despite this, a recent study suggested that the performance of these media varies in detecting yeasts or molds from honey⁴.

Based on these facts, the purpose of this study was to evaluate the influence of the two glucose concentrations in potato agar (2 and 20%) in detecting yeasts and molds from non inspected honey traded in the city of São Paulo.

MATERIAL AND METHODS

Thirty honey samples from the open-air market trade were analyzed between December 2005 and February 2006. Dilution was carried out in 0.1% pepton water until 10⁻² and 0.1mL of each dilution was spread over the culture medium, in duplicate; 1mL of 10⁻¹ dilution was plated in 5 dishes, in duplicate, to reduce the detection limit. Potato agar with 2% and 20% of glucose were used. Plates were incubated at 25°C for 5 days. After registering the Colony Forming Units per milliliter (CFU), the various colonies which were formed were identified and evaluated. One of each colony was streaked along 2% glucose potato agar slant. Yeasts were identified by their macroscopic and microscopic characteristics. All colonies were also subjected physiological tests, according to the literature^{8,9,10}. Filamentous

fungi were identified by macroscopic and microscopic characteristics based on literature^{9,11,12}. The Wilcoxon Signed Rank Test was used to compare the CFU counts from 2% and 20% glucose agar, for the groups: fungi, molds and yeasts.

RESULTS AND DISCUSSION

There was no statistical difference (p=0.399) in CFU.g⁻¹ of fungi between the 2% and 20% glucose potato agar. Results can be observed in Table 1 (median, minimum and maximum values). These results agree with those obtained by Denardi et al.⁴. The better performance of the 20% medium to detect low contamination levels, characterized by fewer occurrences of “<5 CFU.g⁻¹” (Table 2) also corroborates with Denardi’s et al.⁴ findings. Molds were the predominant group in both media. *Penicillium* represented 97.7% and 81.3% of isolates from 2% and 20% glucose potato agar, respectively (Table 3). Matuella and Torres¹³ also found more molds than yeasts in honey, identifying *Penicillium*, *Aspergillus* and *Mucor*.

In addition, there was a difference (p<0.001) when molds from each agar were compared. The same difference applied to yeasts. A larger number of CFU.g⁻¹ of molds was observed in 2% of glucose agar while the counts of yeasts were higher in 20% agar. This result indicates that the media choice will be determinant in the growth of molds or yeasts.

Except for *Penicillium*, all the other molds or yeasts were more isolated in the 20% glucose medium, as shown in Table 4.

Considering that fermentation caused by yeast deteriorates the product and that micotoxigenesis in honey is unlikely, due to its limiting conditions as pointed out by Dragoni et al.⁵, the 20% of glucose agar should be chosen for a more accurate microbiological analysis of honey.

Some interesting results presented in Tables 3 and 4 are the isolation of *Epidermophyton* (Harz) Langeron; Milochevitch, *Trichophyton schoenleinii* (Lebert) Langeron; Milochevitch and *Streptomyces*. There is no evidence in the literature of the presence of the two former microorganisms on food. They are associated to dermatophytosis and are not common in Brazil^{14,15,16}. The latter is actually a bacteria which resembles fungi in their branching filamentous structure and can be isolated from media usually employed for fungi detection¹⁷. *Streptomyces* strains that tolerate high sugar levels

Table 1. Minimum, median, and maximum values of fungi counts in 2% and 20% glucose agar. São Paulo, December 2005 – February 2006.

Values / Culture Medium	2% glucose potato agar	20% glucose potato agar
Minimum value (CFU.g ⁻¹)	<5*	<5
Median (CFU.g ⁻¹)	2.5x10 ¹	3.5x10 ¹
Maximum value (CFU.g ⁻¹)	1.1x10 ⁴	6.1x10 ³

* means the threshold of the technique; no colony was present.

CFU: colony forming units

Table 2. Distribution of samples in fungi count interval, according to the medium employed. São Paulo, December 2005 - February 2006.

Medium / Fungi Count	<5 CFU.g ⁻¹ *	5 — 100 CFU.g ⁻¹	>100 CFU.g ⁻¹
2% glucose potato agar	7/30 (23.33%)	12/30 (40%)	11/30 (36.66%)
20% glucose potato agar	5/30 (16.66%)	20/30 (66.66%)	5/30 (16.66%)

* means the threshold of the technique; no colony was present.

CFU: colony forming units

Table 3. Identification of microorganisms isolated from 2% and 20% glucose potato agar, as well as the number and frequency of colonies from each medium. São Paulo, December 2005 - February 2006.

Microorganisms	Agents	Culture Medium	
		2% glucose	20% glucose
Molds	<i>Penicillium</i>	848 (97.7%)	308 (81.3%)
	<i>Geotrichum</i>	8 (0.9%)	33 (8.7%)
	<i>Streptomyces</i> *	0	6 (1.6%)
	<i>Alternaria</i>	0	2 (0.5%)
	<i>Scopulariopsis</i>	5 (0.5%)	14 (3.7%)
	<i>Aspergillus</i>	3 (0.3%)	8 (2.1%)
	<i>Fusarium</i>	1 (0.1%)	3 (0.8%)
	<i>Gliocladium</i>	0	5 (1.3%)
	<i>Stemphylium</i>	1 (0.1%)	0
	<i>Epidermophyton</i>	1 (0.1%)	0
	<i>Trichophyton schoenleini</i>	1 (0.1%)	0
Total of molds		868	379
Yeasts	<i>Trichosporon pullulans</i> **	3 (75%)	18 (21.9%)
	<i>Rhodotorula</i>	1 (25%)	1 (1.2%)
	<i>Candida krusei</i>	0	63 (76.8%)
Total of yeasts		4	82
Total of fungi		872	461

* bacteria that forms mycelium similar in appearance to the mycelium of some fungi.

** *Trichosporon pullulans* (Lidner) Diddens & Lodder^{8,10}.

Table 4. Microorganisms that showed different CFU.g⁻¹ in 2% and 20% glucose potato agar, and the medium that better recovered the agent and the p value of the difference. São Paulo, December 2005 - February 2006.

Microorganisms	Medium	p value
<i>Penicillium</i>	2%	$p < 0.001$
<i>Geotrichum</i>	20%	$p < 0.001$
<i>Streptomyces</i> *	20%	$p = 0.014$
<i>Aspergillus</i>	20%	$p = 0.020$
<i>Gliocladium</i>	20%	$p = 0.003$
<i>Scopulariopsis</i>	20%	$p = 0.003$
<i>Trichosporon pullulans</i> **	20%	$p < 0.001$
<i>Candida</i>	20%	$p = 0.004$

* bacteria that forms mycelium similar in appearance to the mycelium of some fungi.

** *Trichosporon pullulans* (Lidner) Diddens & Lodder^{8,10}.

have also been isolated from honey in Zambia. Zambian honey has also showed low levels of streptomycin. PCR analysis of honey and environmental samples has shown the presence of the *str* gene cluster which indicates that Streptomycetes are producing streptomycin in the environment from which the Zambian honey is harvested¹⁸.

CONCLUSION

The osmotic pressure of the agar, given by the glucose concentration (2 or 20%), had no influence on fungi quantification in honey, however had a significant effect on the kind of fungi recovered. Potato agar with 2% of glucose favours *Penicillium* spp. while the one with 20% of glucose gives better support to yeasts and other molds than *Penicillium* such as *Geotrichum* spp., *Scopulariopsis* spp. and *Aspergillus* spp. among others.

Finally, the 20% glucose agar should be used to enumerate fungi in honey in order to evaluate its microbiological quality instead of the 2% glucose agar.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank FAPESP for financial support and to Sandra Abelardo Sanches and Orlando Bispo de Souza for the help.

REFERENCES

1. Brasil. Portaria n. 006 de 25 de junho de 1985 da Secretaria de Inspeção de Produto Animal do Ministério da Agricultura. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 jul. 1985. Seção 1, p. 11100. Aprova as Normas higiênico-sanitárias e tecnológicas para mel, cera de abelhas e derivados propostas pela DILEI da SIPA. Available at: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7916>. Accessed 16 may 2007.
2. Brasil. Instrução Normativa n.11, de 20 out 2000 do Gabinete do Ministro do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 out. 2000. Seção 1, p. 23. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Available at: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7797>. Accessed 26 march 2007.
3. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 1996, 182 p.
4. Denardi CAS, Nishimoto EJ, Balian SC, Telles EO. Atividade de água e bolores e leveduras em amostras de méis comercializados na cidade de São Paulo - SP. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005; 64 (2): 219-22.
5. Dragoni I, Cantoni C, Papa A, Vallone L. Muffe alimenti e micotossicosi. Torino: Città Studi. 1997; 318p.
6. Brasil. Portaria 101 de 11 de agosto de 1993 da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 ago. 1993. Seção 1, p. 11937. Aprova e oficializa os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes - métodos microbiológicos. Available at: <http://extranet.agricultura.gov.br/consultasilegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=3876>. Accessed 8 march 2006.
7. Brasil. Instrução Normativa n.62 de 26 de agosto de 2003 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Available at: <http://extranet.agricultura.gov.br/consultasilegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=2851>. Accessed 8 march 2006.
8. Kreeger-Van-Rij NJW. The yeasts: a taxonomic study. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1984. 1082 p.
9. Larone DH. Medically important fungi. A guide to identification. 3rd ed. Washington: ASM Press, 1995. 230 p.
10. Lodder L. The yeast: a taxonomic study. 2nd ed. Amsterdam: North Holland Publishing, 1970. 1385 p.
11. Barnett HL, Hunter BB. Illustrate genera of imperfect fungi. 4th ed. Minneapolis: Burgess, 1998, 241p.
12. Von Arx JA. The genera of fungi sporulating in pure culture. 3rd ed. Vaduz: Journal Cramer, 1980. 315 p.
13. Matuella M, Torres VS. Teste da qualidade microbiológica do mel produzido nos arredores do lixão do município de Chapecó – SC. *Hig Aliment*. 2000;14 (70): 73-7.
14. Georg LK. The diagnosis of ringworm in animals. *Vet Med*. 1954; 49:157-66.
15. Boro BR, Chakrabarty AK, Sarma G, Sarmah AK. Ringworm in animals due to *Epidermophyton floccosum*. *Vet Rec*. 1980; 107: 491-2.
16. Gambale W, Correa B, Paul CR, Purchio A, Larsson CE. Ocorrência de fungos em lesões superficiais de cães na cidade de São Paulo, Brasil. *Rev Fac Med Vet Zoot*. 1987; 24: 187-92.
17. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Bacilos Aeróbios gram-positivos. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC, editores. Diagnóstico microbiológico. Texto e Atlas colorido 5th ed. Rio de Janeiro: Ed MEDSI, 2001. p. 661-718.
18. Zambia Bee Products Association. Bees for Development Honey Trade Workshop - August 2005. Available at: http://www.beesfordevelopment.org/info/proceedings_HTW1/residue_monitoring_plan_results_zambia.htm. Accessed 26 may 2008.

Qualidade microbiológica da água consumida pela população do Distrito do Sana , Macaé, Rio de Janeiro

Microbiological quality of the water consumed by the population of the District of Sana, Macaé, Rio de Janeiro

RIALA6/1160

Gaspar Dias Monteiro RAMOS¹, Hélio Fernandes MACHADO JUNIOR², Valmir Laurentino SILVA³, Fernanda Gomes CASTELAN¹, André Fioravante GUERRA¹, Milton Marques FERNANDES⁴, Arlene GASPAR¹

* Endereço para correspondência: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Av. Br. 465, km 07, Campus UFRuralRJ CEP 23890-000, Seropédica, RJ/Brasil, Fone: (21) 94653308, e-mail: gaspardias@ufrjr.br; gaspar.ramos@bol.com.br

¹ Laboratório Analítico de Alimentos e Bebidas, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, UFRuralRJ

² Departamento de Engenharia Química, Instituto de Tecnologia, UFRuralRJ

³ Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, FIOCRUZ, RJ

⁴ Departamento de Solos, Instituto de Agronomia, UFRuralRJ

Recebido: 11/02/2008 – Aceito para publicação: 03/07/2008

RESUMO

A qualidade da água consumida pela população do Distrito do Sana – Macaé – RJ foi avaliada por meio de análises microbiológicas para pesquisa de coliformes termotolerantes e totais e bactérias heterotróficas baseando-se na Portaria nº 518/2004 – Ministério da Saúde. A água consumida pela população do arraial do Sana é proveniente da captação na microbacia do Palmital e na microbacia da Glória, ambas armazenadas em reservatórios distintos (reservatório do Palmital e reservatório da Glória) e distribuídas para a população sem qualquer tratamento prévio. A cada estação do ano foram coletadas três amostras de cada reservatório. Em função da dificuldade em ter acesso às captações, foi coletada uma amostra por estação. As análises microbiológicas realizadas foram: pesquisa de coliformes totais e termotolerantes pelo método do Número Mais Provável (NMP) por meio de técnica dos tubos múltiplos, e a contagem de bactérias heterotróficas efetuada de acordo com a metodologia recomendada pela APHA. Foi observada elevada contaminação, com níveis acima do estabelecido pela Portaria nº 518/2004 - Ministério da Saúde. A água proveniente da Glória apresentou índices de contaminação maior do que a água proveniente do Palmital. Os resultados verificados no presente estudo indicam a baixa qualidade microbiológica das amostras de água, em função da ausência de prévio tratamento antes do fornecimento à população.

Palavras-chave. qualidade da água, água de consumo humano, coliformes termotolerantes, coliformes totais, bactérias heterotróficas.

ABSTRACT

The quality of the water consumed by the population of the District of Sana - Macaé, RJ was assessed by means of microbiological analyses for detecting thermotolerant and total coliforms and heterotrophic bacteria based on Ministry of Health Decree nº 518/2004. The water consumed by the population of Arraial of Sana is supplied from captation in watershed of Palmital and in watershed of Glória. Both watersheds are stored in distinct reservoirs (reservoir of Palmital and reservoir of Glória), and the water was distributed to population without any treatment. At each season, three samples were collected from each reservoir. For performing the captation, due to difficult of access to them, one sample was collected by season. The following microbiological analyses were carried out: detection of total coliform and thermotolerant coliform by NMP method using multiple tubes technique, and of heterotrophic bacteria counting in accordance to

methodology recommended by APHA. High bacteria contamination was found, in rates above of those acceptable limits established in Decree n° 518/2004, and the water from Glória showed higher levels of contamination than the sample from Palmital. The present study indicates the low microbiological quality of the water samples consumed in the District of Sana, Macaé-RJ, owing to the lack of previous treatment before the water being distributed to population.

Key words. quality of the water, water for human consumption, thermotolerant coliform, total coliform, heterotrophic bacteria.

INTRODUÇÃO

O Rio Sana é um dos mais importantes afluentes do Rio Macaé. Em 30 de novembro de 2001 o Distrito do Sana localizado no município de Macaé foi transformado em Área de Proteção Ambiental (APA), por meio da Lei n° 2.172, pelo poder municipal em apelo aos diversos segmentos da sociedade do Distrito do Sana. A região da bacia do rio Sana apresenta importantes fragmentos de Mata Atlântica e uma riqueza de recursos hídricos e de cachoeiras, os quais são a base da principal atividade econômica local, o ecoturismo. A agricultura e a pecuária são atividades econômicas praticadas por uma parte da comunidade local.

A água é uma necessidade vital para qualquer ser vivo e é utilizada para inúmeras finalidades. Em função do uso a que se destina deve apresentar determinadas características de potabilidade. A potabilidade é definida através de um conjunto de parâmetros e padrões estabelecidos por normas e legislações sanitárias. O Ministério da Saúde (MS), por meio da Portaria n°518 de 25 de março de 2004, estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências¹.

A água contaminada é um importante veículo na transmissão de uma grande variedade de doenças e sua qualidade microbiológica é um fator indispensável para a saúde pública^{2,3}.

A contaminação da água ocorre principalmente por dejetos provenientes do homem e de animais, além de solo e vegetais, favorecendo a persistência e/ou o desenvolvimento de microrganismos patogênicos que podem transmitir ao homem doenças cujos sintomas referem-se principalmente o trato gastrointestinal⁴.

A necessidade de oferecer saneamento tanto para a água de consumo humano como para higiene segue sendo hoje um enorme desafio nos países em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 1100 milhões de pessoas não têm acesso à água tratada e 2600 milhões não têm acesso a um saneamento correto. O resultado é que mais de 4500 crianças menores de cinco anos morrem a cada dia de doenças que se pode prevenir facilmente, como a diarreia. Muitos outros, incluindo crianças com mais de cinco anos e adultos, especialmente mulheres, sofrem enfermidades, são menos

produtivos e tem menos oportunidade de educação⁵.

Coliformes termotolerantes são bactérias do grupo dos coliformes totais que podem fermentar lactose a 44–45°C. Na maioria das águas, o gênero predominante é *Escherichia*, mas alguns tipos de *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter* também são termotolerantes. *Escherichia coli* está presente em fezes humanas e de animais, raramente está ausente em poluição fecal, embora haja alguma evidência para crescimento em terras tropicais⁶.

Bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes são utilizadas mundialmente como parâmetros para verificação de qualidade da água. A Portaria n°518/2004¹ estabelece que água para consumo humano deva ser livre de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes e apresentar ausência em 100mL.

Escherichia, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter* foram considerados gêneros que, tradicionalmente, pertencem ao grupo dos coliformes, porém o grupo é mais heterogêneo incluindo mais gêneros, como *Serratia* e *Hafnia*. O grupo dos coliformes totais inclui os fecais e espécies ambientais⁶.

Escherichia coli sorotipo O157:H7 é uma bactéria emergente, causadora de colite hemorrágica, por meio da produção de toxina, provocando severo dano à mucosa intestinal. Aproximadamente 15% das infecções por *E. coli* O157:H7, especialmente em crianças menores de 5 anos e idosos, podem apresentar uma complicação chamada Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU). A partir da década de 80, infecções por *E. coli* O157:H7, na América do Norte aumentaram, como também a incidência da SHU em vários países. No Brasil, a primeira cepa de *E. coli* O157:H7 foi isolada e identificada em Parelheiros, no município de São Paulo, a partir de uma amostra de água de poço, em uma chácara, não tendo sido identificada em material humano. Não há dados sistematizados sobre a *E. coli* O157:H7 no Brasil e nem sobre a SHU⁷.

A contagem de bactérias heterotróficas, anteriormente denominada contagem padrão em placas é um procedimento para calcular o número de bactérias heterotróficas viáveis em água e medir mudanças durante tratamento e distribuição⁸.

A comunidade do arraial do Sana é bem delimitada e sofre visitas turísticas frequentemente. A água consumida por essa população é proveniente da captação do rio Palmital e do rio Glória, ambas armazenadas em reservatórios distintos (reservatório do Palmital e reservatório da Glória) e distribuídas para a população sem sofrer qualquer tratamento. O

monitoramento de sua qualidade pelos órgãos oficiais e a tomada de ações corretivas da qualidade da água não vem sendo realizados, podendo ocasionar surtos de toxinfecção alimentar por veiculação hídrica.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica da água consumida pela comunidade do Distrito do Sana – Macaé – RJ nas captações e reservatórios de distribuição baseando-se na Portaria nº518/04 – MS, cujos resultados poderão orientar o estabelecimento de metodologias de controle e preservação que visem melhorar a qualidade da água, a serem implementadas pelos órgãos competentes, contribuindo para a saúde das pessoas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado por um período de um ano, compreendendo as quatro estações, iniciando em outubro de 2006 com término em outubro de 2007.

Foram estabelecidos quatro pontos de coleta: captações superficiais da microbacia do Palmital e da Glória e seus respectivos reservatórios de distribuição (Palmital e Glória) que abastecem a população do Arraial do Sana. A cada estação do ano foram coletadas três amostras em cada reservatório de distribuição. Para as captações, devido à dificuldade de chegar até elas, foi coletada uma amostra em cada reservatório por estação.

Na região da bacia hidrográfica do rio Sana são utilizadas duas microbacias para captação e para o abastecimento público de água. A primeira captação superficial situada na microbacia do Palmital é totalmente coberta por floresta de Mata Atlântica e uma segunda captação, também superficial, situada na microbacia da Glória cuja área é de uso agrícola e urbano.

Na captação da água na microbacia do rio do Palmital, a água passa por uma tela objetivando a remoção de folhas, caindo em um pequeno reservatório (aproximadamente 1000 L) para uma simples separação das partículas grosseiras. Esta água é então canalizada utilizando-se tubo de policloreto de vinila (PVC) de 1 polegada, percorrendo 1500 m aproximadamente até uma caixa de passagem (1000 L), seguindo então através de tubulação de PVC de 1^{1/2} polegadas por mais 1500 m aproximadamente até desembocar no reservatório de distribuição do Palmital (48000 L) de onde é canalizada e distribuída para aproximadamente 90 casas.

O sistema de captação na microbacia do rio da Glória é similar ao do Palmital. A água é canalizada, tubo de PVC de 3 polegadas, percorrendo 500 m aproximadamente até desembocar no reservatório de distribuição da Glória (25000 L) onde é canalizada e distribuída para outras 90 casas, aproximadamente.

Todos os reservatórios tanto das captações quanto de distribuição são de alvenaria revestida internamente de cerâmica.

Ambas as águas dos reservatórios (Palmital e Glória) não são submetidas a nenhum tipo de tratamento antes da distribuição.

Mapa de uso do solo

O mapa de uso do solo foi gerado a partir de um mosaico de imagens de satélite do sensor Ikonos II, as quais foram tratadas e georeferenciadas utilizando-se a projeção cartográfica (UTM/SAD-69), escala 1:50.000. Após tratamento e georeferenciamento por meio de *software* específico, cada classe foi vetorizada e separada em camadas representadas por cores diferentes. Foram vetorizadas as classes de uso do solo que mais contribuem para a qualidade ambiental das microbacias.

As classes de uso do solo selecionadas foram descritas de forma detalhada e estão apresentadas abaixo:

Uso antrópico: áreas urbanas ou construídas que constituem as casas, o quintal e o entorno de casas, incluindo ruas e acessos, bem como as áreas de solo exposto e áreas degradadas. É importante frisar que, no caso de áreas construídas, como o trabalho não tinha objetivo de cadastro, o entorno das construções foi determinado como uma área aproximada ao redor das construções. Se havia um aglomerado de construções próximas, estas foram colocadas dentro de uma única unidade de área construída.

Agricultura: pequenas áreas de solo preparado para a implementação de culturas agrícolas ou então áreas com culturas permanentes, como a fruticultura.

Mata ou bosque: áreas de floresta natural e com número significativo de árvores.

Macega ou regeneração: áreas em que a vegetação tem um padrão de rugosidade maior do que as pastagens devido a uma maior exuberância e diversidade de espécies. Há uma grande presença de arbustos e as árvores são ausentes ou em número pequeno.

Pastagem: áreas com plantas forrageiras plantadas ou naturais utilizadas para o pastoreio.

Análises microbiológicas

Na coleta das amostras utilizou-se frascos de vidros estéreis de 500mL.^{8,9} Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em embalagens isotérmicas contendo gelo, porém sem contato direto com o mesmo, e encaminhadas imediatamente ao laboratório.

As análises realizadas foram: pesquisa de NMP de coliformes totais e coliformes termotolerantes pela técnica da fermentação em tubos múltiplos - série de cinco tubos, teste presuntivo utilizando caldo lauril triptose (35°C/24-48h) e teste confirmativo para coliformes totais e termotolerantes utilizando-se caldo verde brilhante lactose bile 2% (35°C/24-48h) e caldo EC (44,5°C/24h), respectivamente; e contagem em placas de bactérias heterotróficas pela técnica “*Pour Plate*”, de acordo com o “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*”, da APHA⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os mapas de uso e ocupação das microbacias do Palmital e da Glória estão representados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. A área de influência da captação do Palmital é

constituída por 100% de mata (Figura 1), com presença de animais silvestres. Próximo à captação, existe área de pastagem protegida por cercas de arame farpado, para dificultar que o gado passe para a área de influência da captação. Esta área é compreendida por aproximadamente 14,35 ha.

A área de influência da captação da Glória (Figura 2) tem 22,9 ha, deste total, a área de pastagem representa 76,5%, de mata 16,5% e de regeneração natural 6,7%. Mostrando que a pastagem tem grande influência a essa captação.

Os resultados da ocorrência de coliformes totais e termotolerantes, bactérias heterotróficas em relação à sazonalidade nas captações e reservatórios estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Observou-se que a captação e o reservatório da Glória têm contagens superiores ao do Palmital para todos indicadores estudados, exceto no outono, onde se observou valor superior para coliformes termotolerantes na captação do Palmital. Esses resultados já eram esperados, pois como mostra a Figura 2, a captação da Glória tem grande influência de área de pastagem, favorecendo a contaminação do rio através da lixiviação, além de dejetos de animais silvestres daquela mata. Apesar da captação e reservatório do Palmital apresentar menores índices de contaminação, do ponto de vista de saúde as duas apresentaram risco, pois estão contaminadas por coliformes termotolerantes.

Observou-se também presença de coliformes totais e bactérias heterotróficas na água nas diferentes estações do ano. Porém, segundo Bastos et al¹⁰ na avaliação da qualidade de águas naturais, os coliformes totais têm valor sanitário limitado. Sua aplicação restringe-se praticamente à avaliação da qualidade da água tratada, onde sua presença pode indicar falha no tratamento, uma possível contaminação pós tratamento ou, ainda a presença de nutrientes em excesso, por exemplo, nos reservatórios ou nas redes de distribuição.

A Portaria nº 518/04¹ estabelece que a água para consumo humano deva ser livre de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes e apresentar ausência em 100mL.

Observou-se ocorrência de coliformes termotolerantes na água nas diferentes estações do ano, apenas no final do

verão e meados do outono a água referente ao reservatório do Palmital não apresentou contaminação (Tabelas 1 e 2). Em relação a saúde pública, estes resultados são importantes, pois indicam que bactérias patogênicas possam estar presentes na água, podendo causar surtos diarreicos e levar ao óbito principalmente em crianças menores que 5 anos, podendo ainda ocasionar infecção das vias urinárias.

Almeida et al.¹¹ verificaram a qualidade microbiológica da água do córrego “Ribeirão dos Porcos”, situado no município de Espírito Santo do Pinhal (SP) encontrando na água proveniente da nascente uma contaminação em relação aos coliformes termotolerantes em média de $7,0 \times 10^2$ NMP/100mL, fora dos limites aceitáveis. Concluíram que esta contaminação pudesse ser proveniente de fezes de animais que habitavam naturalmente a região, pois no ponto onde ocorreram as coletas, não havia contaminação por esgotos domésticos ou outras fontes contaminantes.

Nogueira et al.¹² avaliaram a qualidade microbiológica de amostras de água tratada e não-tratada proveniente de comunidades urbanas e rurais na região de Maringá – PR, mostrando que o maior número de amostras contaminadas por coliformes totais (83%) e coliformes termotolerantes (48%) foi observado em água não tratada. Observaram que mais de 17% da água potável tratada continham coliformes sugerindo tratamento insuficiente ou recrescimento¹².

Soto et al. realizaram um diagnóstico da qualidade da água de poços rasos em 50 escolas da rede pública do Município de Ibiúna-SP, e em relação aos parâmetros microbiológico, encontraram elevada contaminação com níveis acima de 100 UFC (unidades formadoras de colônias) para coliformes totais em 90%, e termotolerantes em 82% das amostras analisadas. Verificaram que os fatores de risco mais representativos foram manutenção dos poços, informação sobre a qualidade da água e seu tratamento¹³.

Os resultados obtidos nessa pesquisa e os resultados das pesquisas realizadas pelos autores acima citado, vêm corroborar a importância do tratamento da água e a manutenção das redes de distribuições, bem como o controle da qualidade, na qual os órgãos públicos são responsáveis.

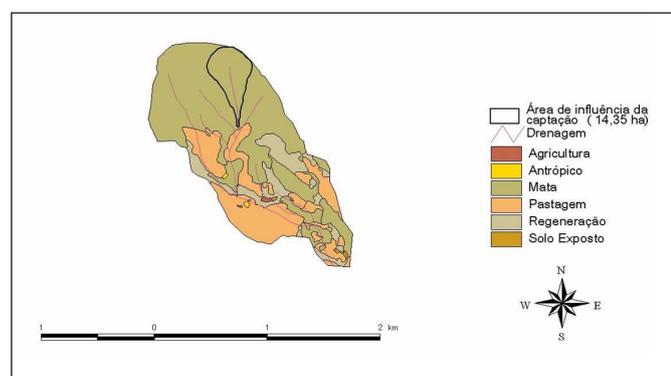


Figura 1. Uso e ocupação da microbacia do Palmital

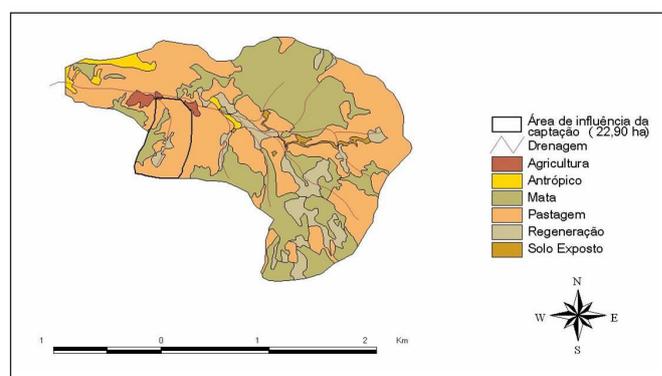


Figura 2. Uso e ocupação da microbacia da Glória

Como as análises realizadas foram para grupos de microrganismos indicadores, a existência de coliformes e bactérias heterotróficas não representa a confirmação da existência de microrganismos patogênicos, porém indicam que estes possam estar presentes na água, sendo o grupo dos coliformes termotolerantes ou *Escherichia coli* os mais utilizados para avaliação da qualidade da água.

Baseando-se na Portaria nº 518/04¹, a água apresentou-se imprópria para o consumo em todas as estações do ano por coliformes termotolerantes. Contrariando o Art. 2º do Capítulo I “Toda água destinada ao consumo humano deve obedecer ao padrão de potabilidade e está sujeita à vigilância da qualidade da água”.

A população do Distrito do Sana, apesar de receber água canalizada, com sistema de distribuição construído pela Prefeitura Municipal de Macaé, não recebe nenhum tratamento como preconizado pela Portaria nº 518/04 – MS¹ preconizado no Art. 22º do Capítulo VI “Toda água fornecida coletivamente deve ser submetida a processo de desinfecção, concebido e operado de forma a garantir o atendimento ao padrão microbiológico desta Norma”.

Levando-se em conta que a população local utiliza diariamente essa água para beber, tomar banho e preparar alimentos, esta pesquisa torna-se um instrumento importante a ser utilizado em ações educativas visando conscientizar a população do perigo que pode ocorrer utilizando água sem

Tabela 1. Determinação de coliformes totais (CT), termotolerantes (CF) e contagem de bactérias heterotróficas relacionando as quatro estações do ano nas captações da Glória (CG) e do Palmital (CP).

Estações do ano	Captação da Glória			Captação do Palmital		
	CT ¹	CF ¹	Contagem de bactérias heterotróficas ²	CT ¹	CF ¹	Contagem de bactérias heterotróficas ²
Primavera	≥1600	≥1600	>3,0x10 ³	≥1600	1600	>3,0x10 ³
Verão	≥1600	27	>3,0x10 ³	300	4	2,7x10 ²
Outono	1600	26	8,6x10 ²	≥1600	900	3,1x10 ²
Inverno	1600	300	>3,0x10 ³	50	8	5,7x10

¹Número mais provável em 100mL

²Unidades formadoras de colônia em 1mL

Tabela 2. Determinação de coliformes totais (CT), termotolerantes (CF) e contagem de bactérias heterotróficas relacionando as quatro estações do ano nos reservatórios da Glória (RG) e do Palmital (RP).

Estações do ano	nº amostras coletadas	Reservatório da Glória			Reservatório do Palmital		
		CT ¹	CF ¹	Contagem de bactérias heterotróficas ²	CT ¹	CF ¹	Contagem de bactérias heterotróficas ²
Primavera	1º	≥1600	≥1600	>3,0x10 ³	≥1600	≥1600	>3,0x10 ³
	2º	≥1600	130	1,5 x10 ²	50	8	3,6x10
	3º	≥1600	30	>3,0x10 ³	500	23	>3,0x10 ³
Verão	1º	900	240	1,7x10 ³	80	50	2,0x10 ²
	2º	900	240	2,0x10 ³	300	50	1,8x10 ²
	3º	≥1600	2	5,4x10 ²	300	ausência	3,8x10
Outono	1º	900	14	2,0x10 ³	500	2	5,6x10
	2º	500	2	1,0x10 ³	220	ausência	8,6x10
	3º	≥1600	170	9,5x10 ²	280	34	7,5x10
Inverno	1º	≥1600	11	>3,0x10 ³	≥1600	2	4,2x10 ²
	2º	300	30	4,9x10 ²	50	8	1,4 x10 ²
	3º	≥1600	500	>3,0x10 ³	≥1600	13	>3,0x10 ³

¹Número mais provável em 100mL

²Unidades formadoras de colônia em 1mL

tratamento e as autoridades para tomar as providências cabíveis.

Observando os hábitos da população que consome a água proveniente da Glória, a sua grande maioria utiliza filtro de barro com elemento filtrante de cerâmica. Esses tipos de filtros conseguem somente remover partículas em suspensão, porém não removem bactérias. A água proveniente do Palmital é consumida sem qualquer uso de filtração.

CONCLUSÕES

Nas condições que o trabalho foi realizado, podemos concluir que:

- Há ocorrência de bactérias do grupo coliformes termotolerantes na água das duas captações e respectivos reservatórios, em todas as estações do ano;
- Essa contaminação pode estar relacionada aos dejetos de animais silvestres ou domésticos, visto que, existem áreas de pastagens acima da captação da Glória e ao lado da captação do Palmital; e
- a água consumida pela população do Sana é imprópria para consumo humano.

Considerando as condições microbiológicas da água consumida pela população do Sana, faz-se necessário:

- implantar sistema de tratamento alternativo para comunidades como a do Sana;
- desenvolver ações de conscientização à população para que evitem a chegada e a permanência dos animais domésticos nas áreas adjacentes as captações;
- implementar programas de educação sanitária e ambiental na comunidade local;
- estimar a incidência de doenças de veiculação hídrica na população por meio de questionário epidemiológico; e
- **promover** o reflorestamento das áreas de influência das captações e das áreas adjacentes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Ediná Rodrigues, técnica do Departamento de Tecnologia de Alimentos - IT – UFRuralRJ, pela colaboração nas análises da água, e a Dilvan Mendonça, funcionário da Prefeitura de Macaé, pela colaboração e disposição na realização de todas as coletas.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Portaria n° 518, de 25 de mar. 2004 do Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1.
2. Giombelli A, Rech H, Torres VS. Qualidade microbiológica da água proveniente de poços e fontes de dois municípios da região do Alto Uruguai Catarinense. *Rev Hig Aliment*. 1998; 12(56):49-51.
3. Zulpo DL, Peretti J, Ono LM, Garcia JL. Microbiological evaluation of water from drinking-fountains of State University of Guarapuava, Paraná State, Brazil. Seminário de Ciências Agrárias de Londrina 2006; 27:107-10.
4. Macêdo JAB. *Águas & Águas*. 2 ed. Belo Horizonte (MG): Conselho Regional de Química-MG; 2004. 977p.
5. Organización Mundial de la Salud (OMS). Informe sobre la salud en el mundo 2007 - protección de la salud pública mundial en el siglo XXI: un porvenir más seguro. 2007. 76p.
6. World Health Organization (WHO). Guidelines for drinking-water quality: incorporating first addendum. Vol. 1, Recommendations. 3rd ed. [Online]. 2006. Disponível em: URL:http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf
7. Divisão de Doenças Transmitidas por Água e Alimentos (DTA). Manual das doenças transmitidas por alimentos e água: *Escherichia coli* O157:H7 - enterohemorrágica (EHEC). [Online]. 2000 [citado 25 jan 2008]. Disponível em: URL:<http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/ecolinet.htm>
8. American Public Health Association (APHA). Microbiological Examination. In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th ed. Washington: APHA, AWWA, WEF; 1998.
9. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Variáveis de qualidade das águas. [Online]. [2007] [citado 26 jun 2007]. Disponível em: URL:<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>
10. Bastos RXX, Bevilacqua PD, Nascimento LE, Carvalho GR, Silva CV. Coliformes como indicadores da qualidade da água: alcances e limitações. In: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Porto Alegre: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000 (CD-ROM). 12p.
11. Almeida RMAA, Hussar GJ, Peres MR, Junior ALF. Qualidade microbiológica do córrego “Ribeirão dos Porcos” no município de Espírito Santo do Pinhal – SP. *Engenharia Ambiental* 2004; 1(1):51-6.
12. Nogueira G; Nakamura CV; Tognim MC; Abreu Filho BA; Dias Filho BP. Microbiological quality of drinking water of urban and rural communities. *Rev Saude Publica*. 2003; 37(2):232-6.
13. Soto FRM; Fonseca YSK; Risseto MR; Azevedo SS; Arini MLB; Ribas MA et al. Monitoramento da qualidade da água de poços rasos de escolas públicas da zona rural do Município de Ibiúna/ SP: parâmetros microbiológicos, físico- químicos e fatores de risco ambiental. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006; 65(2):106-11.

Influência do meio de cultura na determinação da resistência térmica de *Listeria monocytogenes* em formulações para hambúrguer

Influence of the plating medium in the determination of thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in formulations for hamburger.

RIALA6/1161

Maria Helena Castro Reis PASSOS¹, Arnaldo Yoshiteru KUAYE^{1*}

* Endereço para correspondência: Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, nº 80 Campinas, SP/Brasil, Caixa postal 6121 CEP.13083-862 fone: (19) 3521 4097, fax (19) 3289-3517, email: kuaye@fea.unicamp.br

¹ Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos/ FEA/UNICAMP, Campinas, SP/ Brasil

Recebido: 01/04/2008 – Aceito para publicação: 15/08/2008

RESUMO

A influência do meio de cultura na recuperação da população sobrevivente sobre os valores *D* para *L. monocytogenes* foi avaliada em formulações de hambúrguer bovino: 10% de gordura (F1), 20% de gordura (F2), 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio (F3) e 10% de gordura e 10,5% de proteína de soja texturizada hidratada (F4), inoculadas com suspensão mista de 5 cepas de *L. monocytogenes*. Empregando-se ágar triptose fosfato + 1% de piruvato de sódio (ATFP) os valores *D* (min) variaram de 36,11 (F1) a 62,76 (F3) a 55,0°C, de 2,55 (F2) a 4,32 (F3) a 60,0°C e de 0,34 (F1 e F2) a 0,52 (F3) a 65,0°C. Os valores *D* calculados utilizando-se ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LFM) variaram de 23,05 (F1) a 38,54 (F3) a 55,0°C; 1,81 (F2) a 3,06 (F3) a 60,0°C e de 0,25 (F2) a 0,37 (F3) a 65,0°C. Os valores *z* (°C) variaram de 4,81 (F3) a 4,95 (F4) com ATFP e 5,08 (F2) a 5,21 (F4) com LFM. Os autores concluíram que a resistência térmica de *L. monocytogenes* em formulações para hambúrguer bovino foi subestimada até 1,6-1,7 vezes quando o meio LFM foi utilizado.

Palavras-chave. *Listeria monocytogenes*, hambúrguer, resistência térmica, meio de cultura.

ABSTRACT

The influence of the plating medium used for the recovery of survivors, on the *D*-values for *L. monocytogenes*, in formulations for beef hamburger was investigated: 10% fat (F1), 20% fat (F2), 10% fat and 1.5% sodium chloride (F3) and 10% fat and 10.5% hydrated texturized soy protein (F4) were prepared and inoculated with a mixture of five strains of *L. monocytogenes*. Using tryptose phosphate agar containing 1% sodium pyruvate (TPAP) *D*-values (min) ranged from 36.11 (F1) to 62.76 (F3) at 55.0°C, from 2.55 (F2) to 4.32 (F3) at 60.0°C and from 0.34 (F1 e F2) to 0.52 (F3) at 65.0°C. The *D*-values, using lithium chloride phenylethanol moxalactam medium (LPM) for enumeration, ranged from 23.05 (F1) to 38.54 (F3) at 55.0°C; from 1.81 (F2) to 3.06 (F3) at 60.0°C and from 0.25 (F2) to 0.37 (F3) at 65.0°C. The *z*-values (°C), using the TPAP recovery data, ranged from 4.81 (F3) to 4.95 (F4) and from 4.95 (F3) to 5.21 (F4) using the LPM recovery data. The authors concluded that the heat resistance of *L. monocytogenes* in formulations for beef hamburger can be underestimated when LPM is used as the recovery medium.

Key words. *Listeria monocytogenes*, hamburger, heat resistance, culture medium.

INTRODUÇÃO

Os meios de cultura normalmente utilizados para detecção e contagem de *Listeria* spp. contêm antimicrobianos e vários agentes seletivos que visam inibir o crescimento de outros microrganismos presentes no alimento. Entretanto, tem-se demonstrado que nenhum dos agentes seletivos possui especificidade, podendo inibir o crescimento da própria bactéria que se deseja detectar. Esta inibição é mais evidente quando o

microrganismo é submetido a algum tipo de injúria, como a promovida pelo calor¹.

Quando se submete *Listeria monocytogenes* a condições adversas de natureza física ou química em níveis subletais, as células podem ser injuriadas estrutural e fisiologicamente, resultando, inclusive, em aumento da sensibilidade aos agentes inibidores presentes no meio, o que impede sua recuperação e subsequente crescimento. Entretanto, quando inoculadas em meios não seletivos, nutricionalmente ricos, as células injuriadas

podem se recuperar e crescer, tornando possível sua detecção e quantificação^{1,2,3}.

O ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LFM) é um dos meios de cultura mais utilizados e é considerado bastante eficiente para a detecção e contagem de *L. monocytogenes* em alimentos, inclusive produtos cárneos^{4,5}. Entretanto, sua composição não permite o crescimento de células injuriadas pelo calor⁴.

Em trabalhos realizados para determinar a resistência térmica de *L. monocytogenes* em meio de cultura, pode ser observada a utilização de meios não seletivos para contagem dos sobreviventes^{6,7,8}. Entretanto, tem sido demonstrado que esta bactéria é mais resistente ao calor em carne do que em meio de cultura, o que é atribuído a diferenças na composição do substrato de aquecimento^{3,9}. Além disso, o aquecimento em caldo não reproduz a verdadeira condição existente no tratamento térmico do alimento.

Em estudos de determinação da resistência térmica de *L. monocytogenes* em carne bovina moída, pesquisadores têm submetido a carne a um tratamento térmico preliminar para reduzir a microbiota contaminante, possibilitando, assim, a recuperação das células em meios sólidos não seletivos^{9,10,11,12}.

Este trabalho objetivou avaliar a influência do meio de cultura empregado na contagem da população sobrevivente na resistência térmica de *L. monocytogenes* em formulações para hambúrguer bovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo dos ingredientes: carne

Peças de acém (corte dianteiro de bovino), adquiridas no comércio de Campinas-SP, foram imersas em água fervente por 2 minutos. A camada externa foi removida assepticamente e descartada. As porções de carne com maior quantidade de tecido adiposo foram separadas das porções magras e moídas separadamente, para serem utilizadas no ajuste do teor de gordura das formulações. A trituração da carne foi realizada com moedor (Electrolux) provido de disco com furos de 4 mm de diâmetro. As partes removíveis do moedor foram esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 min. Após a retirada de amostras para determinação dos teores de umidade e gordura, contagem de bactérias aeróbias mesófilas e detecção e contagem de *L. monocytogenes*, as porções de carne moída, acondicionadas em sacos plásticos, foram armazenadas a -18°C. O procedimento utilizado no preparo da carne foi similar ao descrito por Schoeniet al.¹².

Preparo dos ingredientes: proteína de soja texturizada (PST)

A PST foi armazenada em recipiente estéril hermético, após remoção de amostra para contagem de bactérias aeróbias mesófilas e detecção e contagem de *L. monocytogenes*.

Preparo das formulações para hambúrguer

Após descongelamento a 4°C/24h, as porções de carne foram homogeneizadas em ambiente asséptico, preparando-se quatro formulações: carne com 10% de gordura (F1), carne com 20% de gordura (F2), carne com 10% de gordura e 1,5% de NaCl (F3) e carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína de soja texturizada hidratada (F4). Antes de adicionada à carne, a PST foi hidratada na proporção de 2:1 (água:PST), por imersão em água estéril a 60°C/20 min.

Após mistura dos ingredientes e trituração das formulações, efetuou-se a remoção de amostras para determinação do pH, atividade de água (Aa), composição centesimal e contagem de bactérias aeróbias mesófilas. As formulações de hambúrguer (100g) foram, então, acondicionadas em sacos plásticos estéreis e armazenadas a -18°C.

Avaliação físico-química e bacteriológica dos ingredientes e das formulações

Análises físico-químicas

Para a determinação de umidade, proteínas e cinzas foram utilizados os métodos descritos, respectivamente, nas seções 24.002, 24.027 e 24.009 da ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC)¹³, e para a gordura empregou-se o método de Bligh e Dyer¹⁴. A determinação do pH seguiu a metodologia descrita por Sebranek¹⁵ (1978 apud Schoeni et. al., 1991)¹², empregando-se potenciômetro (B374, Micronal) previamente calibrado. A Aa foi avaliada utilizando-se higrômetro elétrico (AquaLab, Decagon).

Análises bacteriológicas

Contagem de bactérias aeróbias mesófilas: foi realizada utilizando-se a técnica de inoculação em profundidade com o meio ágar padrão para contagem (APC, Oxoid), incubação a 35°C/48h, conforme recomendado por Morton¹⁶.

Detecção e contagem de *L. monocytogenes*: As amostras foram analisadas através de contagem direta em placas e através de enriquecimento seletivo.

Porções de 25 g de amostra foram homogeneizadas em homogeneizador de pistões (mod.400, Stomacher), com 225 ml de caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB, Oxoid), sem acriflavina, durante 2 min. Alíquotas de 1 ml (subdivididas em 0,3 + 0,3 + 0,3 + 0,1 ml) foram inoculadas superficialmente em placas contendo ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LFM, Difco)¹⁵, com incubação a 30°C/48h. A contagem de colônias típicas de *Listeria* (coloração azulada com aparência de vidro moído) foi realizada com o auxílio da iluminação a 45°, empregando-se iluminador (KL1500, Schott), espelho côncavo e microscópio estereoscópico (4752, Karl Zeiss) conforme Ryser e Donnelly¹⁷.

A presença de *L. monocytogenes* foi avaliada através de enriquecimento seletivo, após adição de acriflavina (Sigma) e homogeneização durante 2 min, seguiu-se a metodologia recomendada por Warburton et al.¹⁸, utilizando-se LFM (Difco) e ágar Oxford (Oxoid) modificado (MOX) para plaqueamento.

Determinação do tempo “Lag” de aquecimento

O tempo “lag” de aquecimento foi determinado a 55,0; 60,0 e 65,0°C. Dois gramas de carne foram acondicionados em tubos de destruição térmica (TDT) ($\phi_{\text{externo}}=8\text{mm}$ e comprimento=105 mm) e inseriu-se um termopar de cobre-constantan (tipo T) (TT T-36, Omega Engineering, Inc.), de forma que a junta de medida ficasse no centro geométrico da amostra. Em seguida, o tubo foi imerso em banho de gelo. Quando a temperatura da carne atingiu 5-6°C, o tubo foi transferido para um banho termostático (H-12105-10, Cole Parmer, precisão de $\pm 0,25^\circ\text{C}$) contendo água e ajustado à temperatura desejada, acionando-se no mesmo instante o cronômetro. Quando a carne atingiu a temperatura do banho, registrou-se o tempo marcado pelo cronômetro (tempo “lag” de aquecimento). A temperatura da amostra durante o aquecimento foi monitorada através do termopar conectado a um registrador de temperatura (H-92800-10, Cole Parmer), previamente programado para registrar a temperatura a cada intervalo de 5 s. Este procedimento foi repetido 10 vezes para cada temperatura, por tipo de formulação. Os instrumentos de medida de temperatura foram aferidos com termômetros de bulbo de mercúrio (ASTM-USA), calibrados com padrões “National Institute of Standards and Technology” (NIST).

Preparo do inóculo

Foi utilizada como inóculo uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes* (*L.m.*): Scott A (sorovar 4b) e quatro cepas isoladas de carne bovina moída *L.m.* 259 (4b), *L.m.* 357 (1/2a), *L.m.* 374 (1/2a) e *L.m.* 410 (1/2a). Todas as cepas, avaliadas conforme recomendado por Lovett e Hitchins¹⁹, apresentaram patogenicidade positiva em testes com camundongos. As culturas-estoque, mantidas a 4°C em tubos com ágar tripticase soja (Oxoid) inclinado contendo 0,6% de extrato de levedura (Difco) (ATS-EL), foram replicadas mensalmente a fim de manter a viabilidade das células.

As culturas foram ativadas mediante três transferências consecutivas para caldo tripticase soja (Oxoid) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (Difco) (ATS-EL), a fim de se obter células na fase estacionária de crescimento. Após incubação a 35°C durante 15 horas, as suspensões foram centrifugadas (J2-21, Beckman) a 5.500 x g a 4°C durante 15 min e lavadas duas vezes com tampão Butterfield. Em seguida, o sedimento final foi suspenso no mesmo diluente, de forma a se obter uma concentração de cerca de 10^{10} UFC/ml, conforme determinado em experimentos preliminares. Volumes iguais de cada cultura foram então misturados, efetuando-se a contagem através de inoculação superficial em placas contendo ágar triptose fosfato (ATF) (caldo tripton fosfato, Difco; 2% de ágar, Merck) e

incubação a 35°C/48h. A mistura assim preparada foi imediatamente inoculada nas formulações.

Inoculação e acondicionamento das formulações nos tubos TDT

Após descongelamento a 4°C/24h, as porções de 100 g de carne foram inoculadas com a mistura de culturas numa proporção de 1% (v/p), seguindo-se uma homogeneização manual e, depois, em homogeneizador de pistões, durante 1 min. Em ambiente asséptico, e com a carne inoculada mantida em banho de gelo, foi efetuado o acondicionamento de 2 g nos tubos TDT procedendo-se, no final, a uma limpeza cuidadosa da parede interna dos tubos com “swab” estéril. Em seguida, os tubos foram fechados com tampa de borracha e armazenados a 4°C/18 h.

Resultados obtidos em testes preliminares demonstraram que o tempo de armazenamento das amostras até o tratamento térmico, não teve influência na resistência térmica da bactéria.

Tratamento térmico e contagem de *L. monocytogenes*

Os tubos foram imersos em banho termostático (H-12105-10, Cole Parmer, precisão de $\pm 0,25^\circ\text{C}$) ajustado à temperatura de 55,0; 60,0 ou 65,0°C, de forma que o nível da água ficasse 2 cm acima do nível da carne.

Quando a amostra atingiu a temperatura do banho (ao final do tempo “lag” de aquecimento), dois tubos foram imediatamente removidos e resfriados em banho de gelo. A partir desse ponto, dois tubos foram removidos a cada um dos seguintes intervalos de tempo:

55,0°C: 20, 40, 60, 80 e 100 min

60,0°C: 2, 4, 6, 8 e 10 min

65,0°C: 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 min

No ensaio a 55,0°C, para a formulação F3, também foram removidos dois tubos após 120 min. Nos experimentos a 65,0°C, adicionalmente, foram retiradas amostras durante o tempo “lag” de aquecimento (dois tubos após 1,0 e 1,5 min, contados a partir da imersão no banho).

Os experimentos foram replicados duas vezes para cada temperatura, por tipo de formulação.

Após resfriamento em banho de gelo, a carne foi transferida para saco plástico estéril, procedendo-se a lavagem do tubo duas vezes com 1,5 ml de tampão Butterfield. O volume de diluente foi então completado para 18 ml, efetuando-se a homogeneização da amostra durante 2 min em homogeneizador de pistões. Em seguida, foram preparadas diluições sucessivas no mesmo diluente, com inoculação superficial em placas contendo ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio (ATFP) (CTF, Difco; 2% de ágar, Merck, piruvato de sódio, Merck) e em LFM (Difco), seguido de incubação a 35 e 30°C durante 72 h, respectivamente. Todas as colônias típicas, observadas através de iluminação a 45°, foram consideradas unidades de *L. monocytogenes*. O mesmo método foi utilizado para avaliação da carne contida em dois tubos que não sofreram tratamento térmico.

Determinação dos valores *D* e *z*

A duração do tratamento térmico empregado foi corrigida para considerar o efeito do tempo “lag”, calculando-se o tempo de aquecimento equivalente à temperatura de referência (temperatura do banho). Nos experimentos realizados a 65,0°C, os intervalos de tempo decorrentes da remoção de amostras durante o tempo “lag” também foram considerados para o cálculo do tempo de aquecimento à temperatura de referência.

Utilizando-se os dados de temperatura registrados durante o tempo “lag” de aquecimento foi possível calcular as taxas letais, empregando-se a fórmula do método geral²⁰:

$$L=10^{(T-T_R)/z}$$

onde *L* é a taxa letal, *T* é a temperatura da amostra durante o aquecimento (°C), *T_R* é a temperatura de referência (temperatura do banho) (°C) e os valores *z* iniciais considerados foram 5,25°C e 5,72°C, para os dados obtidos, respectivamente, em ATFP e LFM [médias dos valores obtidos através de regressão linear das curvas “fantasma” de destruição térmica ($\log_{10} D \times$ temperatura), considerando-se a contagem obtida no tempo “lag” como contagem no tempo “zero” de aquecimento]. O tempo de aquecimento à temperatura do banho foi então calculado empregando-se o método de Patashnik²¹.

Esses tempos corrigidos foram usados na determinação dos valores *D*, obtidos por regressão linear das curvas de sobrevivência (\log_{10} do número de sobreviventes \times tempo de aquecimento). As curvas “fantasma” de destruição térmica ($\log_{10} D \times$ temperatura) foram então traçadas, obtendo-se os valores *z* através de regressão linear. Como a taxa letal é função do valor *z*, todo o cálculo foi repetido até que os valores *z* calculados e os valores *z* iniciais fossem rigorosamente iguais.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), complementando-se a análise com o teste de Duncan para comparação de médias. Em todos os testes foi

considerado um nível de 5% de significância. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa STATISTICA 5.0 (StatSoft, Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação bacteriológica dos ingredientes

A contagem obtida para bactérias aeróbias mesófilas foi de $3,00 \times 10^3$ e $6,10 \times 10^4$ UFC/g para as porções de carne com baixo e alto teor de gordura, respectivamente. Para a PST, obteve-se uma contagem de $2,58 \times 10^2$ UFC/g. Na análise para detecção e contagem de *L. monocytogenes* nos ingredientes não foi observada nenhuma colônia típica.

Avaliação físico-química e bacteriológica das formulações

Na Tabela 1, pode-se observar que a adição de PST à carne (F4) resultou em pequeno aumento do valor de pH, enquanto a adição de NaCl (F3) promoveu redução da *A_a*. Além disso, pode ser verificado que os teores de lipídeos estão próximos aos teores pré-definidos.

A contagem de bactérias aeróbias mesófilas nas formulações foi de $1,05 \times 10^4$; $9,50 \times 10^3$; $3,40 \times 10^4$ e $1,90 \times 10^4$ UFC/g para F1, F2, F3 e F4, respectivamente, indicando que a manipulação e o processo de trituração das formulações não contribuiu para o aumento da contaminação, considerando-se as contagens iniciais do principal ingrediente, a carne.

Determinação dos valores *D* e *z*

A técnica utilizada para redução da contaminação da carne fresca permitiu que a população de *L. monocytogenes* inoculada superasse a população dos contaminantes em pelo menos três ciclos logarítmicos, e possibilitou a contagem da bactéria em ATFP, meio não seletivo que promove a recuperação de células injuriadas pelo calor, sem comprometer os resultados.

Tabela 1. Características físico-químicas das formulações de hambúrguer^a.

Parâmetros	Formulações ^b			
	F1	F2	F3	F4
pH	5,72	5,72	5,69	5,89
<i>A_a</i>	0,990	0,990	0,981	0,990
Umidade (%)	70,71	62,13	68,90	69,54
Proteínas (%)	18,50	16,96	19,08	19,38
Lipídeos (%)	10,38	20,46	10,49	9,77
Cinzas (%)	0,89	0,84	2,22	1,04

^a: valor médio de 3 amostras

^b: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína de soja texturizada hidratada

Observa-se, na Tabela 2, que os valores das contagens obtidas para *L. monocytogenes* nas amostras que não sofreram tratamento térmico não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os dois meios de cultura (ATFP e LFM) na contagem do inóculo inicial.

No trabalho de Fain et al.²² também foi observado que não havia diferença significativa na contagem de *L. monocytogenes* nas amostras de carne que não sofreram aquecimento, quando comparou-se LFM e ágar Columbia contendo 1% de piruvato de sódio.

Buchanan et al.⁴ demonstraram que o LFM, assim como outros meios seletivos utilizados para *Listeria*, promove uma recuperação quantitativa equivalente à do ATFP, quando consideradas células não injuriadas pelo calor.

Na Tabela 3 observa-se que os valores *D* obtidos para *L. monocytogenes* a partir da contagem dos sobreviventes em ATFP foram maiores do que em LFM em todas as temperaturas testadas, independente da formulação. A análise de regressão linear empregada para avaliação das curvas de sobrevivência resultaram em valores R^2 superiores a 0,94 e 0,92, quando foram

Tabela 2. Contagem de *L. monocytogenes* nas formulações de hambúrguer que não sofreram tratamento térmico.

Temperatura ^a (°C)	Repl. ^b	Log ₁₀ UFC/g ^c									
		F1 ^d		F2		F3		F4			
		ATFP ^e	LFM ^e	ATFP	LFM	ATFP	LFM	ATFP	LFM		
55,0	1	7,74	7,75	7,74	7,84	7,85	7,81	7,88	7,95		
	2	7,70	7,71	7,65	7,63	7,84	7,85	7,96	7,93		
60,0	1	7,49	7,59	7,59	7,63	7,53	7,55	7,88	7,87		
	2	7,77	7,84	7,67	7,69	7,74	7,66	8,07	8,12		
65,0	1	7,71	7,75	7,77	7,75	7,75	7,81	8,00	7,98		
	2	7,89	7,86	7,72	7,75	7,78	7,84	8,02	7,97		

^a: temperatura do tratamento térmico subsequente

^b: replicatas 1 e 2

^c: valor médio de 2 amostras. Para cada formulação, não existe diferença significativa ($P > 0,05$) entre os valores médios na mesma linha

^d: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína de soja texturizada hidratada

^e: ATFP: ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio

LFM: ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam

Tabela 3. Valores *D* e *z* para *L. monocytogenes*, inoculada em formulações de hambúrguer, obtidos a partir da contagem dos sobreviventes em ATFP e LFM.

Temperatura (°C)	Meios ^a	Valor <i>D</i> (min) ^b			
		F1 ^c	F2	F3	F4
55,0	ATFP	36,11 (0,74) ^{dA}	39,93 (0,56) ^A	62,76 (1,46) ^A	37,97 (1,33) ^A
	LFM	23,05 (0,15) ^B	23,46 (0,74) ^B	38,54 (0,52) ^B	23,93 (0,32) ^B
60,0	ATFP	2,86 (0,13) ^A	2,55 (0,19) ^A	4,32 (0,08) ^A	3,24 (0,05) ^A
	LFM	2,09 (0,23) ^A	1,81 (0,12) ^A	3,06 (0,01) ^B	2,02 (0,04) ^B
65,0	ATFP	0,34 (0,01) ^A	0,34 (0,01) ^A	0,52 (0,01) ^A	0,36 (0,01) ^A
	LFM	0,27 (0,00) ^A	0,25 (0,00) ^A	0,37 (0,01) ^A	0,29 (0,01) ^A
valor <i>z</i>	ATFP	4,93°C	4,83°C	4,81°C	4,95°C
	LFM	5,18°C	5,08°C	4,95°C	5,21°C

^a: ATFP: ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio

LFM: ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam

^b: valor médio de 2 repetições

^c: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína de soja texturizada hidratada

^d: desvio padrão entre parênteses

^{A, B}: para cada temperatura de aquecimento, valores na mesma coluna seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$)

considerados os dados obtidos, respectivamente, em ATFP e LFM.

Smith e Archer²³ (1988, apud Buchanan et al.⁴) e Bush e Donnelly²⁴ demonstraram que a adição de piruvato de sódio ao meio de cultura não seletivo aumentava a recuperação de *L. monocytogenes* injuriada pelo calor. No entanto, para outros autores^{3,4}, a presença de substâncias inibidoras no LFM, assim como em outros meios utilizados para detecção e contagem de *Listeria* sp., impede a recuperação e subsequente formação de colônias por células submetidas a este tipo de estresse.

Assim sendo, os valores *D* mais elevados obtidos neste trabalho são atribuídos à ausência de agentes seletivos no meio ATFP, e à sua capacidade de aumentar a recuperação das células injuriadas pelo calor, o que resultou na quantificação de um maior número de células viáveis.

Schoeni et al.¹² e Fain et al.²², avaliando a resistência térmica de *L. monocytogenes* em carne bovina moída, também verificaram que a utilização de meios não seletivos, adicionados ou não de piruvato de sódio, resultou na obtenção de valores *D* superiores aos encontrados com LFM. Resultado similar foi obtido por Harrison e Huang²⁵ em carne de caranguejo, comparando os meios ágar tripticase soja e Vogel-Johnson modificado.

Outros autores^{7,8,26,27,28} também mostraram a influência do meio utilizado para contagem dos sobreviventes no valor *D* para *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* O157:H7 e *Yersinia enterocolitica* submetidas a aquecimento em meio de cultura e carne bovina moída.

Analisando-se os dados na Tabela 3, pode ser observado que o efeito do meio de plaqueamento foi mais evidente a 55,0°C, quando os valores *D* encontrados com ATFP foram 1,6 a 1,7 vezes superiores àqueles obtidos com LFM, e diminuiu com o aumento da temperatura. A 60,0°C os valores *D* determinados com ATFP foram 1,4 a 1,6 vezes mais elevados, enquanto que a 65,0°C não foi observada diferença significativa entre os dois meios ($P < 0,05$).

Fain et al.²² também observaram um maior efeito do meio de cultura nos valores *D* determinados a 51,7 do que a 62,8°C. Os valores *D*_{51,7°C} obtidos com ágar Columbia adicionado de piruvato foram quase duas vezes maiores que os valores encontrados com LFM, enquanto que a 62,8°C este aumento variou entre 1,1 e 1,2 vezes. Resultado similar foi obtido por Clavero et al.²⁶ ao submeter *E. coli* O157:H7 a aquecimento entre 54,4 e 68,3°C.

Segundo Golden et al.⁶ e El-Shenawy et al.²⁹ (1989 apud Ollinger-Snyder et al., 1995)³⁰, uma maior parcela da população de *L. monocytogenes* encontra-se em condição de injúria subletal à temperaturas de aquecimento mais baixas do que à temperaturas mais elevadas. Assim, o efeito mais intenso do meio de plaqueamento a 55,0°C observado neste trabalho, pode estar relacionado com o fato de existir uma maior população injuriada a esta temperatura, o que evidenciou a diferença entre os meios quanto à capacidade de recuperação dos sobreviventes.

Na Tabela 3, observa-se que embora os valores *z* obtidos

com LFM sejam maiores do que com ATFP, a diferença (0,14 a 0,26°C) não é significativa. Nos trabalhos citados na literatura, podem ser observadas diferenças entre valores *z* variando de 0 a 1,41°C, quando comparados meios seletivos e não seletivos.

CONCLUSÕES

O procedimento utilizado para redução da contaminação inicial da carne mostrou ser eficiente, e possibilitou a contagem de *L. monocytogenes* em ATFP, meio de cultura não seletivo que permite a recuperação de células injuriadas pelo calor, sem interferência significativa da microbiota contaminante.

O meio de cultura empregado na contagem da população sobrevivente teve influência nos valores *D* obtidos para *L. monocytogenes* submetida a aquecimento em formulações para hambúrguer, principalmente a 55°C. A esta temperatura, os valores *D* obtidos através da contagem em ATFP foram 1,6-1,7 vezes maiores que os encontrados com LFM, o que demonstra que a resistência térmica da bactéria é subestimada quando LFM é utilizado para contagem dos sobreviventes.

Na prática, o tratamento térmico a 55,0°C, temperatura geralmente utilizada no processo “sous vide”, se forem considerados os valores *D* obtidos através da contagem em LFM, o tempo de processo definido como seguro pode vir a ser estabelecido em valores até 1,6-1,7 vezes menores do que seria necessário para garantir que o produto final seja seguro ao consumidor.

Os autores evidenciaram, através dos resultados obtidos, a grande importância da escolha do meio de cultura para os estudos de resistência térmica de *L. monocytogenes* e, possivelmente, de outra microbiota bacteriana presente no produto analisado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro, ao Dr. Ernesto Hofer, da Fundação Oswaldo Cruz, pela sorotipagem das cepas de *L. monocytogenes*, e à Isabela B. Cardoso pelo auxílio técnico.

REFERÊNCIAS

1. Ryser ET, Marth EH, Editors. *Listeria*, *Listeriosis* and *Food Safety*. 2nd ed., New York: Marcel Dekker, Inc.; 1999, p. 131-224.
2. Mossel DAA. *Listeria monocytogenes* in foods. Isolation, characterization and control. *Int J Food Microbiol*. 1989; 8 (3): 183-95.
3. Warburton DW, Farber JM, Powell C, Tiwari NP, Read S, Plante R, Babiuk T, Laffey P, Kauri T, Mayers P, Champagne MJ, Hunt T, Lacasse P, Viet K, Smando R, Coates F. Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol*. 1992; 9 (2): 127-45.

4. Buchanan RL, Smith JL, Stahl HG, Archer DL. *Listeria* methods development research at the eastern regional research center, U.S. Department of Agriculture. *J Assoc Official Anal Chem*. 1988; 71(3): 651-4.
5. Yu LSL, Fung DY. Evaluation of FDA and USDA procedures for enumerating *Listeria monocytogenes* in ground beef. *Food Microbiol*. 1991; 8 (1): 69-74.
6. Golden DA, Beuchat LR, Brackett RE. Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. *Food Microbiol*. 1988; 5 (1): 17-23.
7. Linton RH, Pierson MD, Bishop JR. Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heat shock. *J Food Prot*. 1990; 53 (11): 924-7.
8. Linton RH, Webster JB, Pierson MD, Bishop JR, Hackney CR. The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Food Prot*. 1992; 55 (2): 84-7.
9. Jorgensen F, Stephens PJ, Knochel S. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol*. 1995; 79 (3): 274-81.
10. Pagán R, Condón S, Sala FJ. Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*. 1997; 63 (8): 3225-32.
11. Quintavalla S, Campanini M. Effect of rising temperature on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat emulsion. *Lett Appl Microbiol*. 1991; 12 (5): 184-7.
12. Schoeni JL, Brunner K, Doyle MP. Rates of thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beef and fermented beaker sausage. *J Food Prot*. 1991; 54 (5): 334-7.
13. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14th ed. 1984. 1141p.
14. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959; 37: 911-7.
15. Sebranek JG. *Meat science and processing*, Paladin House Publishers, Geneva, 1978.
16. Morton RD. Aerobic Plate Count. In: Downes FP, Ito K, editors. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th ed. Washington: Ed APHA; 2001, p.63-8.
17. Ryser ET, Donnelly CW. *Listeria*. In: Downes FP, Ito K, editors. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th ed. Washington: Ed APHA; 2001, p.343-56.
18. Warburton DW, Farber JM, Babiuk T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: Canada Health and Welfare. *Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological analysis of foods*. Polyscience; 1991, v.3[MFHPB 30]
19. Lovett J, Hitchins AD. *Listeria* isolation. In: Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 6th ed. (Suppl) 2nd printing (2/89). Association of Official Analytical Chemists, 1989, Chap. 29, p.29.01-29.14.
20. Stumbo CR. *Thermobacteriology in Food Processing*. 2nd ed. Academic Press; 1973. 329p.
21. Patashnik M. A simplified procedure for thermal process evaluation. *Food Technol*. 1953; 7(1): 1-6.
22. Fain AR Jr, Line JE, Moran Ab, Martin LM, Lechowich RV, Carosella JM, Brown WL. Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott A: D-value e z-value determinations in ground beef and turkey. *J Food Prot*. 1991; 54(10): 756-61.
23. Smith JL, DL. Archer. Heat-induced injury in *Listeria monocytogenes*. *J Ind Microbiol*. 1988; 3: 105-10.
24. Busch SV, Donnelly CW. Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Appl Environ Microbiol*. 1992; 58(1): 14-20.
25. Harrison MA, Huang YW. Thermal death times for *Listeria monocytogenes* (Scott A) in crabmeat. *J Food Prot*. 1990; 53 (10): 878-80.
26. Clavero MRS, Beuchat LR, Doyle MP. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from ground beef and bovine feces, and suitability of media for enumeration. *J Food Prot*. 1998; 61 (3): 285-9.
27. Craven SE, Blakenship LC. Increased heat resistance of salmonellae in beef with added soy proteins. *J Food Prot*. 1983; 46 (5): 380-4.
28. Doherty AM, McMahon CMM, Sheridan JJ. Thermal resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in meat and potato substrates. *J Food Safety*. 1998; 18 (2): 69-83.
29. El-Shenawy MA, Yousef AE, Marth EH. Thermal inactivated injury of *Listeria monocytogenes* in reconstituted nonfat dry milk. *Milchwiss*. 1989; 44 (12): 741-5.
30. Ollinger-Snyder P, El-Gazzar F, Matthews ME, Marth EH, Unklesbay N. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in ground pork prepared with and without soy hulls. *J Food Prot*. 1995; 58 (5): 573-6.

Qualidade microbiológica de pescado beneficiado em indústrias paraenses

Microbiologic quality of fish processed in industries of Northern region of Brazil

RIALA6/1162

Maria do Carmo Andion FARIAS¹, José de Arimatéia FREITAS^{2*}

*Endereço para correspondência: Travessa Humaitá nº 1130, apartamento 103, Pedreira, CEP-66085-220, Belém, PA/ Brasil, email: jaf.bel@terra.com.br

¹ Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará- ADEPARÁ, Belém-Pará/Brasil

² Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal da Amazônia- UFRA, Belém, PA/ Brasil

Recebido: 22/04/2008 – Aceito para publicação: 01/09/2008

RESUMO

Foi realizado o estudo retrospectivo de nove meses no período de maio de 2005 a janeiro de 2006, sobre a qualidade microbiológica de pescado beneficiado pelas indústrias paraenses. A investigação foi efetuada com base nos resultados de análises microbiológicas de detecção de *Salmonella* spp, contagem de *Staphylococcus aureus*, contagem de coliformes fecais e número mais provável (NMP) de *Vibrio parahaemolyticus*, em 133 amostras (51 peixes eviscerados congelados, 54 filés de peixe congelados, nove peixes em posta congelados, dois peixes inteiros congelados, quatro peixes eviscerados frescos, três caudas de lagosta congeladas e dez camarões sem cabeça congelados). As análises foram processadas conforme os métodos, procedimentos e recomendações oficiais. Foi observada ausência de *Salmonella* spp e NMP de *Vibrio parahaemolyticus* em concordância com o padrão oficial estabelecido. Nas técnicas de contagem de *Staphylococcus aureus* e de coliformes fecais foram determinados baixos percentuais de amostras discordantes dos padrões microbiológicos. O pescado beneficiado por indústrias paraenses apresentou qualidade adequada para consumo, em decorrência de elevados percentuais de amostras que apresentaram dados concordantes com os padrões microbiológicos oficiais.

Palavras-chave. pescado, beneficiamento de pescado, controle microbiológico de pescado, vigilância sanitária de pescado.

ABSTRACT

A retrospective study on the microbiologic quality of fish processed, under federal inspection, in industries of Northern region of Brazil was performed for nine months from May 2005 to January 2006. This investigation was based on the results from the microbiologic analyses of 133 samples (51 frozen eviscerated fishes, 54 frozen filleted fishes, nine frozen pieced fishes, two frozen whole fishes, four fresh eviscerated fishes, three frozen lobster tails, and ten of frozen shrimp without head). The analyses were performed in accordance with officially established methods, procedures and recommendations. The absence of *Salmonella* spp and MPN of *Vibrio parahaemolyticus* in accordance with official criterias were observed. Low percentages of samples presented disagreement with official standard criteria in relation to *Staphylococcus aureus* and faecal coliformes counts. The fishes processed in industries located in Northern area of Brazil showed an adequate quality suitable for consumption, as the high percentages of samples were in accordance with official sanitary standards.

Key words. fish, fish processing, microbiologic quality of fish, sanitary surveillance of fish, Brazil.

INTRODUÇÃO

Peixes, moluscos e crustáceos são alimentos de elevado valor biológico que alcança até 100,0% e fácil digestibilidade; como matérias-primas de origem animal destinadas ao beneficiamento, necessitam de adequados procedimentos tecnológicos, para manutenção da estabilidade físico-química, sensorial e microbiológica^{1,2,3}.

Após a captura o pescado deteriora gradualmente, devido a fatores endógenos e exógenos, entre esses os microrganismos que penetram na musculatura através das brânquias, pele e cavidade abdominal^{1,3,4}.

O pescado pode albergar agentes microbianos e ser contaminado ou ter multiplicado a flora microbiana inicial, em qualquer um dos segmentos da cadeia produtiva. Por isso, a legislação sanitária impõe limites à presença de microrganismos, patogênicos ou deterioradores, para garantir a segurança alimentar e a qualidade desse tipo de alimento^{5,6,7,10,11}.

A qualidade higiênica dos produtos da pesca no Brasil é muito variável e influenciada por fatores ambientais, ação eutrófica humana, localização geográfica, diversidade microbiana e os segmentos da cadeia produtiva^{1,2,3,7,9}.

O estado do Pará é, na atualidade, um importante produtor de pescado, cuja produção é dirigida para o consumo interno e externo e necessita apresentar qualidade sanitária, como matéria-prima destinada ao beneficiamento industrial e alimento humano^{6,8,9}.

O objetivo do presente estudo foi levantar a qualidade microbiológica do pescado beneficiado por indústrias paraenses.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Dados de análise microbiológica de 133 amostras de pescado beneficiado em 20 indústrias localizadas no estado do Pará, fiscalizadas pelo Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, constituíram o objeto do presente estudo.

As amostras analisadas incluíram 51 de peixe eviscerado congelado, 54 de filé de peixe congelado, nove de peixe congelado em postas, duas de peixe inteiro congelado, quatro de peixe eviscerado fresco, três de cauda de lagosta congelada e dez de camarão sem cabeça congelado, colhidas nas indústrias de beneficiamento, transportadas segundo normas de acondicionamento e enviadas ao laboratório oficial regional da rede LANARA localizado em Belém, Pará.

Métodos

Foi realizado um levantamento abrangendo nove meses no período de Maio de 2005 a Janeiro de 2006. Os dados referentes às amostras analisadas e os métodos empregados foram levantados nos laudos do laboratório regional oficial,

disponibilizados pelas indústrias nas quais os produtos foram beneficiados.

No Laboratório oficial regional as amostras foram submetidas a métodos analíticos de contagem de coliformes fecais, pesquisa de *Salmonella* spp, contagem de *Staphylococcus aureus* e número mais provável (NMP) de *Vibrio parahaemolyticus*, conforme técnicas e procedimentos adotados pelo órgão federal de fiscalização do setor; os resultados foram comparados aos padrões oficiais (Brasil, 1992, 2001)^{10,11}.

Preparo de Diluições

Para cada amostra e as análises de pesquisa de *Salmonella* spp, contagem de coliformes fecais e contagem de *Staphylococcus aureus* pesou-se, asépticamente, em sacos plásticos de “stomacher”, 25g de amostra colhida de vários pontos, superfície e profundidade e adicionou-se a 225 mL de solução salina peptonada a 0,1%; para a análise do NMP de *Vibrio parahaemolyticus* pesou-se 50g e adicionou-se 450mL de caldo peptonado sal 3%. Homogeneizou-se por aproximadamente 60 segundo no “stomacher”, preparando-se, assim, a diluição 10⁻¹, a partir da qual preparam-se as diluições 10⁻² e 10⁻³, conforme procedimentos técnicos rotineiros.

Semeio, Incubação e Expressão de Resultados

Empregando-se as diluições preparadas foram realizadas as análises microbiológicas, conforme os procedimentos a seguir descritos.

Contagem de Coliformes Fecais

Inicialmente, procedeu-se à contagem de coliformes, com o semeio de 1mL de inóculo (diluição) em placas de Petri por profundidade; em seguida, adicionou-se agar cristal violeta vermelho neutro bile, homogeneizando-se e uma segunda camada do mesmo meio, homogeneizando-se; as placas permaneceram em repouso e foram levadas à incubação a 36°C±1°C por 18-24 horas, procedendo-se à observação das características das colônias nas placas com 15 a 150 colônias. Três a cinco colônias foram semeadas em tubos de verde brilhante bile 2% lactose contendo tubinho de Duhram, incubando-se a 36°C±1°C por 24-48 horas, para confirmação, leitura e expressão de resultado.

A seguir, semeiou-se colônias presuntivas de coliformes (análise anterior) em tubos de caldo EC, incubando-se a 45°C±0,2°C por 24-48 horas, em banho-maria com agitação, observando-se a formação de gás nos tubinhos de Duhram.

Contagem de *Staphylococcus aureus*

Semeio de 1mL de inóculo (diluição) em três placas de ágar Baird Parker, respectivamente, 0,4mL, 0,3mL e 0,3mL, pela técnica “spread plate”, repouso dos inóculos e incubação a 36°C±1°C por 30-48 horas, com observação de colônias típicas e atípicas, semeando-se três a cinco colônias de cada tipo em tubos de infusão de cérebro coração e incubação a 36°C±1°C por 24 horas, para obtenção de cultura pura, a partir da qual

foram realizados os testes complementares da prova de coagulase, bacterioscopia ao Gram, pesquisa de termonuclease e prova da catalase, conforme procedimentos técnicos rotineiros.

NMP de *Vibrio parahaemolyticus*

Semeio de 1mL de inóculo (diluição) em três séries de três tubos de caldo glicose teepol, incubação a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas, com observação de turvação ou não do meio, a partir do qual procedeu-se ao isolamento em agar tiosulfato citrato sais biliares com incubação a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e observação de colônias típicas.

Pesquisa de *Salmonella*

A partir da suspensão inicial, diluição 10^{-1} , que permaneceu durante 1 hora em repouso, procedeu-se as seguintes etapas com semeio em meios líquidos (caldos): 1. Pré-enriquecimento da suspensão inicial, com incubação a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 16-20 horas; 2. Enriquecimento Seletivo, com inoculação a partir da etapa anterior em meios líquidos seletivos caldo Rappaport Vassiliadis, incubação a $41^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em banho-maria com agitação por 24-30 horas; caldo selenito cistina com incubação a $41^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em banho-maria com agitação por 24-30 horas; caldo tetrationato com incubação a $41^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em banho-maria com agitação por 24-30 horas. 3. Isolamento em meio sólido, a partir do enriquecimento seletivo em caldo Rappaport Vassiliadis e caldo selenito cistina, incubação a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas. 4. Provas Bioquímicas de produção de urease, reações em agar três açúcares ferro (TSI) ou agar Kliger (KIA), descarboxilação da lisina, motilidade e prova da oxidase; todas de conformidade com técnicas, recomendações e meios específicos.

RESULTADOS

Na pesquisa de *Salmonella* spp e NMP de *Vibrio parahaemolyticus* 100,0% das amostras estavam em concordância com os padrões oficiais, ausência em 25g e $10^3/\text{g}$, respectivamente. Na contagem de *Staphylococcus aureus* e contagem de coliformes fecais foram determinados 98,5% e 1,5% e 93,9% e 6,1% de amostras concordantes e discordantes dos padrões oficiais, respectivamente (Tabela 1).

Em relação à contagem de *Staphylococcus aureus*, 50 (98,0%) e uma (2,0%) amostras de peixe eviscerado congelado e 53 (98,1%) amostras e uma (1,9%) amostra de filé de peixe congelado atenderam e não atenderam, respectivamente, ao padrão estabelecido pela legislação federal, máximo de 10^3 UFC/g; os demais produtos atenderam integralmente ao referido padrão. Nenhuma cepa de *Staphylococcus aureus* era coagulase positiva.

Todas as amostras analisadas segundo o NMP de *Vibrio parahaemolyticus* apresentaram resultados que atenderam em 100,0% ao referido padrão oficial, 10^3 NMP/g.

A contagem de coliformes fecais demonstrou que 48

(94,1%) amostras e três (5,9%) amostras de peixe eviscerado, 50 (92,6%) amostras e quatro (7,4%) amostras de filé de peixe congelado e uma (50,0%) amostra e uma (50,0%) amostra de peixe inteiro congelado, respectivamente, atenderam e não atenderam ao padrão oficial, máximo $5,0 \times 10^2$ UFC/g; os demais produtos atenderam integralmente ao referido padrão. Não foi confirmada a presença de *E. coli* entre os coliformes termotolerantes.

DISCUSSÃO

Na pesquisa de *Salmonella* spp o resultado determinado, ausência em 25g, (Tabela 1), foi superado pelos resultados observados em produtos semelhantes (peixe congelado, peixe inteiro congelado, peixe fresco e peixe congelado em postas) e peixe defumado, nos quais esse microrganismo estava presente, em níveis variados, em até 80,0% das amostras^{12,15}. No entanto, superou o também alto percentual de ausência desse patógeno, 63,6%, em peças de diversos peixes comercializados no município de São José do Rio Preto-SP¹³ e mostrou-se semelhante ao resultado de ausência desse patógeno em camarões de água doce (*Macrobrachium amazonicum*, *M. jelskii*) comercializados em Penápolis-SP e Mendonça-SP¹⁴.

De modo contrário ao determinado nos produtos analisados, *Salmonella* spp foi observada em amostras de cortes de tilápia (*Orochromus niloticus*) congelados comercializados em Alfenas-MG⁹. *Salmonella* spp foi também identificada em amostras de caranguejo (*Ucides cordatus*) comercializado em Fortaleza-CE¹⁶.

A ocorrência de *Salmonella* spp em alimentos de origem animal revela, além da discordância com o padrão oficial, risco sanitário para o consumidor. A ausência desse microrganismo nos produtos beneficiados pelas indústrias paraenses, qualificou-os como alimentos próprios para o consumo em relação a esse importante agente de infecção alimentar.

Na contagem de *S. aureus*, o resultado discordante do padrão oficial, média de 1,5% (Tabela 1), foi muito inferior àqueles determinados em peixe beneficiado em São José do Rio Preto-SP, pescado beneficiado por empresas do estado do Ceará, amostras de pescado analisadas em Florianópolis-SC, pescado de água doce comercializado no município de Alfenas-MG e camarões de água doce (*Macrobrachium amazonicum*, *M. jelskii*) colhidos em Penápolis-SP e Mendonça-SP, que variaram de 44,3% até 100,0%^{9,13,14,17}.

Contagens de *S. aureus* acima de 10^3 UFC/g podem indicar, ao mesmo tempo, provável contaminação oriunda de manipulação e inadequada sanitização de utensílios e risco sanitário potencial, o que torna evidente a importância do controle higiênico-sanitário nos estabelecimentos industriais e comerciais, quanto a mão-de-obra, equipamentos e superfícies que entram em contato com o pescado¹⁸.

O NMP de *V. parahaemolyticus* demonstrou que esse microrganismo estava presente em cinco tipos dos produtos

analisados no nível de 10 NMP/g, portanto com 100,0% de concordância com o padrão oficial. No entanto, o NMP de *Vibrio* spp determinado em amostras de caranguejo (*Ucides cordatus*) comercializado em Fortaleza-CE variou de 110 a 110.000/g, e das cepas identificadas 80,00% eram de *V. parahaemolyticus*¹⁶. Mas, embora Pereira et al⁷ tenham identificado esse patógeno em 13,5% das amostras de mexilhão (*Perna perna*) e 86,4% das amostras de ostra (*Crassostrea rizophorae*), procedentes de bancos naturais e restaurantes no Rio de Janeiro-RJ, o NMP determinado atendeu também ao padrão fixado pela legislação brasileira.

V. parahaemolyticus foi detectado em cinco tipos de pescado beneficiado por indústrias paraenses (Tabela 1), porém em todos eles o NMP estava de conformidade com a legislação vigente. De modo semelhante, esse patógeno foi também identificado em uma amostra de ostra (*Crassostrea rizophorae*) coletada em estuário na cidade de Fortaleza-CE e em 8,0% das amostras cruas e 11,5% das amostras pré-cozidas de mexilhão (*Perna pernas*) procedentes de cultivo na cidade do Rio de Janeiro-RJ^{19,20}.

Diferentemente da metodologia empregada na presente pesquisa, *V. parahaemolyticus* foi também detectado através da técnica de contagem em diversas espécies de peixe comercial exposto ao consumo no município de São José do Rio Preto-SP, cujo resultado nas condições da pesquisa realizada atendeu ao padrão fixado pela legislação brasileira vigente, máximo 5,0x10³ UFC/g¹³.

Na contagem de coliformes fecais apenas um baixo número de oito (6,1%) amostras estava em desacordo com o padrão oficial. Esse resultado foi superado, em termos comparativos, por aqueles determinados através do NMP em peças congeladas de tilápia (*Orochromus niloticus*), camarões de água doce e pescado comercial fresco^{9,14,21}. Foi, no entanto,

comparativamente semelhante, 98,5% para 100,0% de concordância com os respectivos padrões, ao resultado do NMP determinado em diferentes espécies de peixe comercial exposto ao consumo em São José do Rio Preto-SP, que estava de conformidade com o padrão oficial¹³.

Não foi confirmada a presença de *E. coli* entre os coliformes termotolerantes, em nenhum dos tipos de pescado analisados. No entanto, a presença de *E. coli* foi confirmada em duas (18,2%) das espécies de peixe comercial exposto ao consumo em São José do Rio Preto-SP¹³; a presença de *E. coli* foi também confirmada em oito (66,7%) das amostras de camarão dulcícola (*Machrobrachium amazonicum* e *M. jelskii*) integral e descabeçado, colhidos em Penápolis-SP e Mendonça-SP¹⁴. Muratori et al²¹ apenas referiram-se ao isolamento de *E. coli* em 14 (41,2%) das amostras de carpa capim (*Curimatus ciliatus*) comercializada em Terezina-PI²¹ e Vieira et al(2004)¹⁶, do mesmo modo, apenas informaram a identificação de *E. coli* no decorrer de pesquisa de *Vibrio* spp e *Salmonella* spp em amostras de caranguejo (*Ucides cordatus*) comercializado em Fortaleza-CE.

Os resultados precedentes que indicaram discordância com o padrão oficial para coliformes fecais, 5 x 10³ UFC/g, inclusive o da presente pesquisa e aqueles que confirmaram a presença de *E. coli* nos respectivos produtos são preocupantes, pois representam alimentos impróprios para o consumo do ponto-de-vista sanitário e risco potencial para a saúde do consumidor.

A ocorrência desse grupo de microrganismos em pescado pode indicar captura realizada em ambientes com poluição fecal. Falhas ocorridas durante a captura, manipulação, armazenamento, transporte e beneficiamento, podem ser também responsabilizados pela ocorrência de coliformes fecais termotolerantes e *E. coli* em pescado.

Tabela 1. Levantamento da qualidade microbiológica de pescado beneficiado por indústrias paraenses, no período de Maio de 2005 a Janeiro de 2006, segundo o tipo de produto, as análises realizadas e a comparação dos resultados com padrões oficiais. Belém, 2008.

Tipo de produto	Análise realizada															
	Pesquisa de <i>Salmonella</i>				Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>				Contagem de coliformes fecais				NMP de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>			
	Dentro padrão		Fora padrão		Dentro padrão		Fora padrão		Dentro padrão		Fora padrão		Dentro padrão		Fora padrão	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Peixe ^{a,b}	51	100,0	0	0,0	50	98,0	1	2,0	48	94,1	3	5,9	20	100,0	0	0,0
Filé peixe ^b	54	100,0	0	0,0	53	98,1	1	1,9	50	92,6	4	7,4	13	100,0	0	0,0
Peixe ^b posta	9	100,0	0	0,0	9	100,0	0	0,0	9	100,0	0	0,0	-	-	-	-
Peixe inteiro ^b	2	100,0	0	0,0	2	100,0	0	0,0	1	50,0	1	50,0	-	-	-	-
Peixe ^a fresco	4	100,0	0	0,0	4	100,0	0	0,0	4	100,0	0	0,0	4	100,0	0	0,0
Camarão s/cabeça ^b	10	100,0	0	0,0	10	100,0	0	0,0	10	100,0	0	0,0	10	100,0	0	0,0
Cauda lagosta ^b	3	100,0	0	0,0	3	100,0	0	0,0	3	100,0	0	0,0	3	100,0	0	0,0
Total	133	100,0	0	0,0	131	98,5	2	1,5	125	93,9	8	6,1	50	100,0	0	0,0

Nota: a= eviscerado; b= congelado; dentro do padrão= de conformidade com o padrão oficial, próprio para consumo; fora do padrão= sem conformidade com o padrão oficial, impróprio para o consumo.

CONCLUSÕES

Os resultados do levantamento realizado permitiram concluir:

1. Todos os produtos de pescado analisados estavam de conformidade com o padrão microbiológico oficial de *Salmonella* spp, ausência em 25g de produto.

2. A quase totalidade das amostras de produtos de pescado beneficiados por indústrias paraenses estava de conformidade com os respectivos padrões oficiais dos demais microrganismos analisados.

3. Os percentuais abaixo de 10% de amostras não concordantes com os padrões de contagem de coliformes fecais e contagem de *Staphylococcus aureus*, respectivamente, em peixe eviscerado congelado, filé de peixe congelado e peixe inteiro congelado e em peixe eviscerado congelado e filé de peixe congelado, podem indicar provável contaminação fecal da água no ambiente de captura ou nas indústrias e provável contaminação cruzada no processamento dos produtos.

REFERÊNCIAS

- Bertullo VH. Tecnologia de los productos y subproductos de pescados, moluscos y crustáceos. 1ª ed. Buenos Aires: Editorial Hemisfério Sur; 1975.
- Huss HH. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. Roma: FAO; 1997. Documento Técnico Sobre as Pescas nº 334.
- Scherer R, Daniel AP, Augusti, PR, Lazzari, R., Lima, R. L., Fries, L. M. et al. Effect of chlorinated ice on chemical and microbiological features of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) flesh. *Ciênc Tecnol Aliment*. [serial online] 2004 Out-Dez [cited 2007Feb24];24(4):680-684. Available from: URL: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612004000400034&Ing=en&nrm=iso.
- Barros CG. Perda da qualidade do pescado, deteriora e putrefação. *Rev Cons Fed Medicina Veterinária* 2003; 2(30):59-66.
- Brasil. Portaria nº 368 de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova o Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 set. 1997. Seção 1, n.172, p.196-97*
- Brasil. Portaria nº 185 de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (inteiro e eviscerado). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, 15 mai. 1997. Seção 1, nº158, p.102-108*
- Pereira CS, Viana CM, Rodrigues DP. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas in natura em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004;24(4):591-5
- Leitão L. Pará é o maior produtor de pescado do Brasil. *Rev Amazônia em Outras Palavras* 2004; 3(11):7-12
- Pacheco TA, Leite RGM, Almeida AC, Silva NMO, Fiorini JE. Análise de coliformes e bactérias mesofílicas em pescado de água doce. *Hig Aliment*. 2004;18(116/117): 68-72
- Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. I – Métodos microbiológicos. Brasília, 1992. 136p.
- Brasil. Resolução RDC nº 12 de 2001 da Fundação Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília-DF, 10 jan 2001. Seção I, nº 7-E, p.45-53.*
- Gonçalves A, Hernandez CP. Defumação líquida de anchova (*Pomatus saltatrix*), efeito do processamento nas propriedades químicas e microbiológicas. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1998;18 (4):438-43.
- Hoffmann FL, Garcia-Cruz CH, Vinturim TM, Fázio MLS. Levantamento da qualidade higiênico-sanitária do pescado comercializado na cidade de São José do Rio Preto, SP. *Hig Aliment*. 1999;14(64):45-7.
- Reis AJ, Hoffmann P, Marcos ML, Tadei GF, Gonçalves, MVT. Estudo higiênico-sanitária dos camarões dulcícolas *Macrobrachium amazonicum* Jelskii. *Hig Aliment*. 2004;18(116/117): 50-3.
- Dams RI, Ribeirão LH, Teixeira E. Avaliação da qualidade microbiológica da pescadinha (*Cynoscion striatus*) inteira e em filé nos principais pontos críticos de controle de uma indústria de pescado congelado. *Bol Cent Estadual Pesq Alimentar*. 1996;14:151-62.
- Vieira RHSF, Lima EA, Souza DBR, Reis EF, Costa RG, Rodrigues DP. *Vibrio* spp and *Salmonella* spp, presence and susceptibility in crabs *Ucidea cordatus*. *Rev Inst Med trop*. 2004;46(4):179-82
- Hylui JD, Pinheiro CH, Mourão FA, Macedo PE, Carvalho LM. Avaliação da qualidade dos produtos pesqueiros no estado do Ceará. *Hig Aliment*. 1996;11(45):37-47
- Evangelista-Barreto NS. Investigação sobre possíveis portadores de *Staphylococcus aureus* em duas indústrias de pescado [Dissertação de mestrado]. Fortaleza, Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2001. 56pp
- Souza OV, Vieira, RHSF, Menezes FGR, Reis CMF, Hofer E. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio Cholerae* in Oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from natural nursery in the Cocó river estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. *Rev Inst Méd trop*. 2004; 46(2):59-62.
- Pereira CS, Possas CA, Viana CM, Rodrigues DP. *Vibrio* spp isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos de estação experimental de cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007; 27(2):387-90.
- Muratori MCS, Costa APR, Viana MC, Rodrigues PC, Podestá Jr RL. Qualidade sanitária do pescado “in natura”. *Hig Aliment*. 2004;18(116/117):50-3.

Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação

Investigation of the antimicrobial resistance patterns in *Staphylococcus aureus* isolated in the milking of cows in the lactation

RIALA6/1163

Luiz Francisco ZAFALON^{1*}, Juliana Rodrigues Pozzi ARCARO², Antônio NADER FILHO³, Luciano Menezes FERREIRA⁴, Lívia CASTELANI⁵, Fabiane BENVENUTTO⁵.

* Endereço para correspondência: ¹ Embrapa, Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste/ CPPSE, Rodovia Washington Luís, Km 234, Caixa Postal 339. CEP 13560-970, São Carlos, SP/Brasil, e-mail: zafalon@cppse.embrapa.br

² Instituto de Zootecnia, Centro de Bovinos de Leite, Nova Odessa, SP/Brasil

³ Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP/Brasil

⁴ Instituto Aequitas, Araraquara, SP/Brasil

⁵ Instituto de Zootecnia, Centro de Bovinos de Leite, Bolsistas Fundap, Nova Odessa, SP/Brasil.

Recebido: 28/04/2008 – Aceito para publicação: 11/08/2008

RESUMO

Os perfis de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados a partir do leite de vacas com mastite, óstios papilares dos tetos e das teteiras foram estudados. As amostras de leite e dos óstios foram obtidas antes da ordenha dos animais e as das teteiras antes e durante a ordenha. Os testes de sensibilidade *in vitro* foram realizados de acordo com a técnica de Kirby e Bauer, utilizando-se 12 princípios ativos, com confirmação prévia de todas as amostras de *S. aureus* por técnicas moleculares. O perfil de resistência mais comum de *S. aureus* isolados no leite, óstios e insufladores foi à penicilina (48,3%, 36,8% e 25,9%, respectivamente). Além disso, em todas as fontes estudadas encontrou-se *S. aureus* com resistência à oxacilina, com características de multiresistência a outros antimicrobianos. O tratamento da mastite bovina deve ser realizado somente após o conhecimento da sensibilidade dos microrganismos responsáveis pela etiologia da doença aos diversos antimicrobianos. O isolamento de estirpes resistentes à oxacilina ilustra os riscos de transmissão destes patógenos pelo leite.

Palavras-chave. mastite, *S. aureus*, leite, resistência a antimicrobianos.

ABSTRACT

The resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of dairy cows with mastitis, teat orifices and mouthpieces of the liners were studied. The samples from the milk and teat orifices were obtained before milking and samples from mouthpieces were obtained before and in the course of milking. The Kirby and Bauer standardized disc diffusion test was performed with previous confirmation of isolates by molecular method. The resistance to penicillin was predominant to the isolates from milk, teat orifices and mouthpieces (48.3%, 36.8% and 25.9%, respectively). The resistance to oxacillin was found in all sources studied, with characteristics of multidrug resistance. The bovine mastitis treatment is recommended after sensitivity tests to the different antimicrobials of microorganisms responsible by aetiology. The identification of strains oxacillin-resistant explains the care with the possibility of transmission of *S. aureus* by milk.

Key words. mastitis, *S. aureus*, milk, antimicrobial resistance.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma importante causa de mastite (inflamação da glândula mamária) em vacas leiteiras e as glândulas mamárias são os principais reservatórios a partir dos quais as bactérias são transmitidas para as outras vacas. Apesar de medidas preventivas evitarem a transmissão do patógeno de um animal a outro e reduzirem a incidência da doença, as infecções originadas de outras fontes como a ordenhadeira, o ar, a pele do animal e humanos, contribuem para a manutenção da doença no rebanho¹. A bactéria também é conhecida como causadora de várias doenças purulentas no homem e animais, com possibilidade de transmissão entre ambos. Existem relatos sobre a ocorrência de cepas de *S. aureus* isoladas de leite bovino associadas a casos de infecção humana e resistentes a vários antibióticos. O acompanhamento dos perfis de resistência aos antimicrobianos de *S. aureus* é amplamente utilizado como ferramenta em estudos epidemiológicos de casos de infecção hospitalar em humanos².

A sensibilidade de *S. aureus* aos diferentes antibióticos empregados no tratamento das doenças animais é de grande importância para o médico veterinário, pois visa fornecer subsídios para a terapia do animal acometido, bem como para todos os animais do rebanho submetidos às mesmas condições de manejo e, portanto, sob os mesmos riscos de infecção. Por todo o mundo, o aumento de prevalência de *S. aureus* multi-resistentes causadores de mastite bovina é grave, com a redução da efetividade de antimicrobianos e o aumento da morbidade e dos custos para combater a doença. Existe heterogeneidade genética considerável em populações naturais de *S. aureus*. Além disso, este é um importante patógeno responsável por casos de doenças de origem alimentar, por meio da ingestão de toxinas, constituindo um problema de saúde pública^{3,4}.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo estudar os perfis de resistência de *S. aureus* isolados dos óstios dos tetos e do leite de vacas em lactação, além das teteiras dos conjuntos de ordenha, a fim de caracterizá-los e analisar o antibiograma como um teste discriminatório para estes.

MATERIAL E MÉTODOS

Aprovado pelo Comitê de Ética da Embrapa Pecuária Sudeste em 14/04/2008

Características da propriedade rural e do rebanho

As vacas lactantes do Centro de Bovinos de Leite do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, São Paulo, foram estudadas. A ordenha era mecânica em sistema de circuito fechado e realizada duas vezes ao dia. A população bovina constituiu-se de vacas P.O., holandesas e pardo-suíças.

Seleção dos animais

Entre agosto de 2005 e dezembro de 2006, todas as vacas lactantes e sadias foram submetidas mensalmente à prova do

California Mastitis Test (CMT) para o diagnóstico de mastite subclínica ou inaparente, na qual reações positivas eram verificadas por meio da formação de viscosidade à leitura da mistura entre leite e reagente. Investigou-se, também, animais com o quadro clínico de mastite, com alterações macroscópicas do leite ou da glândula mamária. Durante o estudo, a mediana de vacas em lactação na propriedade foi de 52 animais, com um número mínimo de 40 e máximo de 66 animais em lactação.

Amostragem de leite dos quartos mamários

As amostras de leite que apresentaram qualquer grau de reação ao CMT e as de quartos mamários com mastite clínica foram colhidas de acordo com os procedimentos recomendados pelo *National Mastitis Council*⁵. Após a limpeza do óstio papilar com álcool etílico 70% (v/v), utilizou-se tubos de ensaio esterilizados e coletou-se de 2 a 5 mL de leite, em duplicatas, de cada quarto mamário, antes do início da ordenha. Estas amostras foram acondicionadas em recipientes com gelo e levadas ao laboratório para isolamento e identificação bacterianos.

Amostras obtidas a partir dos óstios papilares

Imediatamente após a anti-sepsia efetuada pelo ordenhador, coletou-se amostras dos óstios papilares de animais positivos ao CMT, independentemente se todos os quartos foram reagentes, com o auxílio de suabe estéril, por meio da realização de movimentos circulares sobre o óstio⁶. O transporte foi realizado em tubos de vidro individuais com água peptonada estéril.

Amostras obtidas das teteiras

Suabes estéreis foram friccionados em movimentos circulares na porção final de cada um dos insufladores (quatro por cada conjunto de ordenha), em todos os conjuntos da ordenhadeira⁷. Os suabes foram transportados em tubos de vidro individuais com água peptonada estéril. As colheitas foram realizadas durante e após as ordenhas.

Isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus*

O leite oriundo dos quartos mamários foi semeado diretamente em placas de Petri com ágar sangue de ovino a 5%, com auxílio de alça de platina, enquanto as amostras oriundas dos óstios e dos insufladores foram semeadas com os suabes utilizados nas colheitas. Todas as placas foram incubadas por 18 a 24 horas, a 37°C. As colônias foram submetidas à coloração de Gram, com posterior realização das provas de catalase e coagulase lenta com plasma de coelho⁸. Os cocos Gram-positivos com reações positivas nas provas da catalase e coagulase foram, então, submetidos à prova para verificação da produção de acetoína e utilização da maltose e da trealose. As amostras positivas a estas provas foram classificadas como *S. aureus*⁹.

Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Os isolados foram submetidos aos testes de sensibilidade *in vitro* a partir da técnica de difusão em disco¹⁰

em placas de ágar Müeller-Hinton, frente a 12 antimicrobianos representados pela gentamicina (10 µg), penicilina (10 UI), oxacilina (1 µg), tetraciclina (30 µg), cefepime (30 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), sulfazotrim (25 µg), vancomicina (30 µg), clindamicina (2 µg), ciprofloxacina (5 µg) e rifampicina (5 µg). A aferição dos halos de inibição formados em torno dos respectivos princípios ativos foi realizada segundo o preconizado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS)¹¹.

Análises moleculares das amostras

Previamente aos testes de sensibilidade *in vitro*, confirmou-se a participação de *S. aureus* na etiologia da doença pela extração e amplificação do DNA cromossomal específico¹². Para a extração do DNA bacteriano, foi utilizado o Kit GFX Genomic Blood® (GE Healthcare, Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil), que contém o protocolo de extração de DNA para bactérias Gram positivas, as soluções de lise, de extração e de lavagem e colunas GFX de purificação. Foi realizado, também, um pré-tratamento com lisozima para auxiliar na lise bacteriana.

A amplificação de fragmentos de DNA cromossômico específico do *S. aureus* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Martineau et al.¹³. As reações compreenderam volume final de 20 µL contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada *dNTP*, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador Sa442-1 (5'- AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG- 3') e Sa442-2 (5'- CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA- 3'), e 0,5 U de *Taq* polimerase em amplificação do tipo *host-start*. As misturas de PCR foram submetidas à desnaturação, por 3 min, a 94 °C e, posteriormente, a 30 ciclos de 1 s, a 95 °C, para desnaturação e 30 s, a 55 °C, para pareamento e extensão dos oligonucleotídeos iniciadores. Dez microlitros do produto amplificado foram visualizados após eletroforese em gel de agarose em concentração de 2% corado com brometo de etídio. Marcador

de tamanho molecular 100 pb foi utilizado como padrão de peso molecular.

Avaliação da capacidade discriminatória do antibiograma

A capacidade discriminatória foi determinada segundo Hunter e Gaston¹⁴, pelo cálculo do índice numérico de discriminação “D”, baseado na probabilidade de duas amostras não relacionadas e tomadas de uma mesma população, estarem classificadas em diferentes grupos de tipagem. O índice foi dado pela seguinte equação:

$$D = 1 - 1/N(N-1) \sum_{j=1}^S nj(nj-1)$$

Onde “N” é o número total de amostras na população, “S” é o número total de tipos descritos e “n_j” é o número de amostras pertencente a cada tipo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na mastite bovina, os programas de controle de *S. aureus* estão focados no combate à disseminação dos microrganismos de animal para animal e o monitoramento do estado infeccioso do rebanho é aspecto importante para o controle da doença¹⁵. O conhecimento dos padrões de resistência antimicrobiana do microrganismo é necessário e fundamental para o desenvolvimento de métodos preventivos que sejam efetivos, assim como para a construção de estratégias de tratamento, quando necessárias³.

Na Tabela 1 encontra-se a classificação de sensibilidade/resistência aos princípios ativos testados, de acordo com a origem dos isolados de *S. aureus*.

Os princípios ativos aos quais os microrganismos originados do leite e óstios apresentaram a maior suscetibilidade

Tabela 1. Resultados do antibiograma (em %) de princípios ativos testados contra *S. aureus* oriundos de leite, óstios e insufladores.

Princípios ativos	Sensibilidade			Perfil intermediário			Resistência		
	L ²	O ³	I ⁴	L	O	I	L	O	I
Sulfazotrim (147; 56; 27) ¹	97,3	91,1	88,9	0,0	1,8	3,7	2,7	7,1	7,4
Cloranfenicol (145; 56; 27)	95,2	92,8	88,9	4,1	1,8	7,4	0,7	5,4	3,7
Oxacilina (145; 56; 27)	96,6	67,9	55,6	0,0	0,0	3,7	3,4	32,1	40,7
Gentamicina (146; 56; 27)	91,8	83,9	85,2	2,0	3,6	3,7	6,2	12,5	11,1
Tetraciclina (146; 55; 27)	91,8	80,0	81,5	6,8	1,8	0,0	1,4	18,2	18,5
Rifampicina (146; 55; 27)	84,9	67,3	59,3	12,3	12,7	14,8	2,7	20,0	25,9
Cefepime (145; 56; 27)	77,2	60,7	63,0	16,6	16,1	3,7	6,2	23,2	33,3
Clindamicina (147; 56; 27)	69,4	53,6	33,4	25,8	21,4	25,9	4,8	25,0	40,7
Ciprofloxacina (145; 56; 27)	65,5	71,4	70,4	28,3	23,2	29,6	6,2	5,4	0,0
Eritromicina (147; 55; 27)	38,8	36,4	33,3	60,5	52,7	55,6	0,7	10,9	11,1
Penicilina (147; 56; 27)	36,7	17,9	7,4	0,0	0,0	0,0	63,3	82,1	92,6

¹ Número de amostras testadas para leite, óstios e insufladores, respectivamente; ² Amostras oriundas do leite; ³ Amostras oriundas de óstios; ⁴ Amostras oriundas de insufladores.

foram o sulfazotrim e o cloranfenicol, respectivamente. Os isolados dos insufladores também apresentaram suscetibilidade superior a estes princípios ativos, 88,9% para ambos. Por outro lado, a penicilina foi o princípio ativo ao qual os microrganismos originados de leite, óstios e insufladores apresentaram maior resistência (63,3%, 82,1% e 92,6%, respectivamente). Ao considerar as sensibilidades médias de *S. aureus* isolados em leite, óstios e insufladores aos diferentes antimicrobianos, os percentuais mais elevados foram encontrados para o sulfazotrim (92,4%), cloranfenicol (92,3%), gentamicina (87,0%) e tetraciclina (84,4%) (dados não tabelados). Considerando-se as médias da resistência aos antimicrobianos das três fontes estudadas, os princípios aos quais os microrganismos apresentaram as percentuais mais elevados foram à penicilina (79,3%), oxacilina (25,4%), clindamicina (23,5%) e cefepime (20,9%) (dados não tabelados). Níveis superiores de resistência à oxacilina foram verificados para as amostras originadas de óstios e insufladores (32,1% e 40,7%, respectivamente), enquanto nos isolados originados do leite dos quartos mamários foi encontrado um percentual de resistência à oxacilina igual a 3,4%.

Na Tabela 2 encontram-se os diferentes padrões de resistência aos antimicrobianos para as estirpes de *S. aureus* isoladas no leite.

No leite dos quartos mamários com mastite houve uma maior prevalência de estirpes com resistência única à penicilina (48,3%), seguidas por aquelas que não apresentaram resistência

a quaisquer dos antimicrobianos testados (33,8%). A sensibilidade a todos os princípios ativos testados foi inferior à encontrada por Ferreira et al.¹², cujos resultados revelaram 75,3% de estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Lange et al.¹⁶ relataram 48,5% de isolados de *S. aureus* sensíveis a todos os antimicrobianos testados e 43,9% resistentes à penicilina e à ampicilina. O amplo uso de penicilinas na medicina veterinária pode favorecer o desenvolvimento de resistência e explicar a maior prevalência de amostras resistentes a este princípio ativo.

Costa et al.¹⁷ também referiram-se a uma maior resistência de *Staphylococcus* isolados de casos de mastite clínica e subclínica aos antimicrobianos do grupo dos betalactâmicos-penicilina. Estes microrganismos produzem betalactamases com capacidade de cindir o anel betalactâmico da estrutura do antimicrobiano, constituindo-se no principal mecanismo de resistência. Em humanos, o aumento da resistência bacteriana em amostras isoladas de processos infecciosos parece não ser somente pelo mau e intenso uso, mas também pela transmissão via alimentos de origem animal ou pelo contato direto com animais de produção.

Duzentos e doze isolados de *S. aureus* obtidos de 58 propriedades leiteiras foram examinados quanto à resistência a antimicrobianos e um total de 24,5% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano dentre os testados. A resistência à penicilina e à sulfadimetoxina foram as mais comuns (9,9% e 7,5%,

Tabela 2. Padrões de resistência aos antimicrobianos de estirpes de *S. aureus* isoladas no leite em casos de mastite bovina.

Fenótipos de resistência aos antimicrobianos ¹	Nº de estirpes	% ²
Pen	70	48,3
Sensibilidade a todos os antimicrobianos testados	49	33,8
Pen, Cip	5	3,4
Pen, Gen	3	2,0
Pen, Cpm	2	1,4
Pen, Oxa, Cpm, Cli, Rif, Sut, Gen	1	0,7
Pen, Oxa, Cpm, Cli, Rif, Gen	1	0,7
Pen, Oxa, Cpm, Sut, Cli, Gen	1	0,7
Pen, Oxa, Cpm, Cli, Cip, Gen	1	0,7
Pen, Oxa, Cpm, Sut, Cli, Rif	1	0,7
Pen, Cpm, Clo	1	0,7
Pen, Cpm, Cip	1	0,7
Pen, Eri	1	0,7
Pen, Sut	1	0,7
Pen, Rif	1	0,7
Pen, Tet	1	0,7
Pen, Cli	1	0,7
Cpm, Cip	1	0,7
Gen	1	0,7
Cli	1	0,7
Cip	1	0,7
Total	145	100,0

¹Pen: penicilina; Gen: gentamicina; Oxa: oxacilina; Cpm: cefepime; Eri: eritromicina; Cli: clindamicina; Tet: tetraciclina; Rif: rifampicina; Sut: sulfazotrim; Clo: Cloranfenicol; Cip: ciprofloxacina. ² (percentagens relacionadas ao total de amostras).

respectivamente)³. Dentre 815 amostras isoladas de casos de mastite bovina¹⁸, todas foram sensíveis à oxacilina, ciprofloxacina, tiamulina, vancomicina, virgamicina, ceftiofur, florfenicol, quinupristina/dalfopristina e trimetoprim+sulfametoxazole, enquanto 32,4% das amostras foram resistentes à penicilina. André et al¹⁹ verificaram que, dentre *S. aureus* obtidos a partir de manipuladores, amostras de leite cru e queijo, todos foram suscetíveis à ciprofloxacina e à gentamicina, enquanto 65,4% apresentaram resistência à penicilina e 3,8% à oxacilina; 15,4% foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina, gentamicina, vancomicina, oxacilina e penicilina) e 25% foram resistentes a mais de um antimicrobiano. Pacheco et al.²⁰ encontraram percentual de resistência de *S. aureus* à penicilina de 75,1% e verificaram sensibilidade das amostras à associação entre trimetoprim e sulfonamidas, que reduziu-se conforme o andamento do estudo.

Constitui-se em um motivo de preocupação a ocorrência de *S. aureus* resistentes a mais de um princípio ativo, o que traz dificuldades ao tratamento de animais com mastite. Porém, o valor aqui encontrado (15,9%) foi inferior ao citado por Nader Filho et al.²¹, igual a 100,0%. O isolamento de *S. aureus* resistentes a diferentes grupos de antibióticos usados no combate da mastite pode estar

condicionado, entre outros fatores, ao mau uso de produtos com a aplicação em subdosagens ou um período insuficiente de tratamento dos animais. Associados às normas higiênicas de manejo de ordenha mal conduzidas, estes fatores favorecem a existência de portadores de *S. aureus* resistentes e facilitam a transmissão dessas bactérias entre animais de um mesmo ambiente, inclusive pelas mãos do ordenhador e de utensílios destinados à ordenha².

A tipagem epidemiológica de amostras bacterianas pode ser feita por uma ampla variedade de técnicas. O poder discriminatório de um método de tipagem, por sua vez, é a habilidade do método em distinguir entre amostras não relacionadas e é determinado pelo número de tipos definidos pelo teste e as freqüências relativas destes tipos¹⁴. Vinte e um padrões foram identificados para as estirpes de *S. aureus* isoladas no leite de quartos com mastite. Assim, a capacidade da técnica do antibiograma em distinguir as amostras de *S. aureus* oriundas do leite de vacas com mastite foi de 65,5%. Este valor foi superior ao encontrado por Ferreira et al.¹², igual a 42%, porém inferior ao de Lange et al.¹⁶, que relataram 85%.

Na Tabela 3 estão contidos os diferentes fenótipos de resistência aos antimicrobianos de *S. aureus* isolados a partir dos óstios.

Tabela 3. Padrões de resistência aos antimicrobianos de estirpes de *S. aureus* isoladas em óstios de tetos oriundos de quartos mamários sadios.

Fenótipos de resistência aos antimicrobianos ¹	Nº de estirpes	% ²
Pen	21	36,84
Sensibilidade a todos os antimicrobianos	8	14,04
Pen, Oxa, Cpm	4	7,02
Pen, Oxa, Cpm, Eri, Cli, Rif	2	3,51
Pen, Tet	2	3,51
Pen, Cip	2	3,51
Pen, Oxa, Cpm, Rif	1	1,75
Pen, Oxa, Cpm, Cli, Rif	1	1,75
Pen, Cli	1	1,75
Pen, Oxa, Cpm, Eri, Sut, Cli, Tet, Rif, Gen	1	1,75
Pen, Oxa, Cpm, Eri, Cli, Tet, Rif, Gen	1	1,75
Pen, Oxa, Cpm, Eri, Cli, Tet, Rif, Clo	1	1,75
Pen, Oxa, Cpm, Eri, Cli, Clo, Gen	1	1,75
Pen, Oxa, Cpm, Sut, Tet, Clo, Gen	1	1,75
Pen, Oxa, Cpm, Cli, Tet, Rif, Gen	1	1,75
Pen, Oxa, Cpm, Cli, Tet, Rif	1	1,75
Pen, Oxa, Cpm, Cli, Tet	1	1,75
Pen, Oxa, Cpm, Cli, Sut	1	1,75
Pen, Cli, Tet, Rif, Gen	1	1,75
Pen, Oxa, Cpm, Sut	1	1,75
Pen, Cpm, Rif	1	1,75
Pen, Cip, Gen	1	1,75
Cpm, Cli	1	1,75
Cpm	1	1,75
Total	57	100,0

¹Pen: penicilina; Gen: gentamicina; Oxa: oxacilina; Cpm: cefepime; Eri: eritromicina; Cli: clindamicina; Tet: tetraciclina; Rif: rifampicina; Sut: sulfazotrim; Clo: Cloranfenicol; Cip: ciprofloxacina. ² (percentagens relacionadas ao total de amostras).

Nos óstios foram encontrados 24 diferentes padrões de resistência, com 36,8% de resistência única à penicilina e 14% de suscetibilidade a todos os antimicrobianos. Estes valores foram inferiores aos encontrados para os microrganismos isolados do leite, cujas porcentagens foram de 48,3% e 33,8%, respectivamente. A capacidade discriminatória do antibiograma em distinguir as amostras de *S. aureus* isoladas em óstios foi de 84,5%, superior à encontrada para as amostras isoladas a partir do leite dos animais com mastite. Além disso, enquanto os isolados do leite exibiram cinco padrões que abrangeram a resistência à oxacilina, um total de 3,4% do total de amostras, *S. aureus* isolados a partir dos óstios exibiram 14 padrões que abrangeram a resistência a este princípio ativo, o que correspondeu a 31,6% das amostras. Os isolados provenientes dos óstios apresentaram uma maior amplitude de resistência aos antimicrobianos, quando comparados aos oriundos do leite dos quartos com mastite. Este fato não significa, necessariamente, que os microrganismos responsáveis pela mastite bovina não apresentam um maior número de padrões de resistência. Talvez haja a possibilidade deles, no caso do isolamento feito a partir do leite, se encontrarem no interior de fagócitos e apresentarem uma possibilidade menor de isolamento bacteriológico.

A Tabela 4 apresenta *S. aureus* oriundos dos insufladores, com os respectivos perfis de resistência.

De acordo com a tabela 4, *S. aureus* com resistência única à penicilina foram mais comuns (25,9%). Este percentual foi inferior aos encontrados no leite e em óstios (48,3% e 36,8%, respectivamente). Os microrganismos isolados nos insufladores apresentaram 18 padrões diferentes, comparados aos 21 e 24 padrões das amostras de leite e óstios, respectivamente. A capacidade discriminatória do antibiograma para as amostras dos insufladores foi de 93,2%, superior às obtidas para os microrganismos isolados no leite (65,5%) e em óstios (84,5%).

A múltipla resistência de estirpes de *S. aureus* isoladas da água usada no processo de obtenção do leite foi constatada, em propriedades rurais da região de Jaboticabal, São Paulo²². Os achados foram preocupantes pelo papel da água como veiculadora de agentes infecciosos da mastite bovina, além da totalidade de *S. aureus* isolados apresentarem-se como resistentes à oxacilina. Concomitantemente às coletas de amostras efetuadas e constantes do presente trabalho, *S. aureus* foram pesquisados na água utilizada para a higienização das teteiras e para a lavagem dos tetos das vacas, imediatamente antes da ordenha e esta espécie não foi isolada. Também no presente trabalho, uma proporção superior de isolados resistentes à oxacilina nos insufladores e nos óstios dos tetos foi encontrada, em relação às amostras de leite. Poderiam estes achados estar relacionados com a presença das bactérias na água de higienização, onde as teteiras eram mergulhadas após a ordenha de cada animal, antes de serem colocadas no próximo

Tabela 4. Distribuição das estirpes de *S. aureus* isoladas de insufladores dos conjuntos de ordenha e seus padrões de resistência.

Padrão de resistência ¹	Nº de estirpes	% ²
Pen	7	25,9
Sensibilidade a todos os antimicrobianos	2	7,4
Pen, Cli	2	7,4
Pen, Oxa, Cpm	2	7,4
Pen, Oxa, Cpm, Eri, Cli, Tet, Rif, Gen	1	9,1
Pen, Oxa, Cpm, Cli, Tet, Rif, Gen	1	3,7
Pen, Oxa, Cpm, Eri, Cli, Rif	1	3,7
Pen, Oxa, Cpm, Cli, Tet, Rif	1	3,7
Pen, Oxa, Cpm, Sut, Cli, Rif	1	3,7
Pen, Oxa, Cpm, Cli, Rif	1	3,7
Pen, Cpm, Cli, Tet, Gen	1	3,7
Pen, Oxa, Cpm, Cli	1	3,7
Pen, Oxa, Cpm, Sut	1	3,7
Pen, Oxa, Cpm, Tet	1	3,7
Pen, Eri, Cli	1	3,7
Pen, Clo	1	3,7
Pen, Com	1	3,7
Pen, Rif	1	3,7
Total	27	100,0

¹ Pen: penicilina; Gen: gentamicina; Oxa: oxacilina; Cpm: cefepime; Eri: eritromicina; Cli: clindamicina; Tet: tetraciclina; Rif: rifampicina; Sut: sulfazotrim; Clo: Cloranfenicol; Cip: ciprofloxacina. ² (porcentagens relacionadas ao total de amostras).

animal a ser ordenhado. Porém, conforme mencionado anteriormente, não isolou-se *S. aureus* em amostras de água. Assim, apesar de não ser estudada a presença destes microrganismos nas mãos dos funcionários responsáveis pela ordenha, estes poderiam carrear as bactérias até os insufladores e para os óstios dos tetos, no momento em que as teteiras eram manuseadas antes da ordenha das vacas ou mesmo durante o manuseio dos tetos durante a lavagem com água, imediatamente antes da ordenha.

Microrganismos com resistência às penicilinas resistentes à penicilinase e classificados como *S. aureus* meticilina (oxacilina)-resistentes (“MRSA”) são frequentemente resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo os aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluorquinolonas^{23,24}. Isolados “MRSA” devem ser considerados resistentes a todas as cefalosporinas e outros β -lactâmicos como a ampicilina, a amoxicilina, o ácido clavulânico, a combinação ticarcilina-ácido clavulânico e os carbapenems, devido aos resultados dos testes de sensibilidade *in vitro* obtidos, além de existirem evidências clínicas de que os isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina não respondem ao tratamento *in vivo* com cefalosporinas. A infecção do homem pelo consumo de produtos como o leite contaminado com linhagens “MRSA” de origem animal é possível e, uma vez ocorrida a transferência interespecie, estes microrganismos podem tornar-se disseminados no meio animal²⁵.

Strommenger et al.²⁶ relataram elevada prevalência de novas amostras epidêmicas emergentes de MRSA, com menor amplitude dos padrões de resistência. Porém, dentre as cinco amostras de *S. aureus* aqui isoladas a partir do leite, com resistência à oxacilina (Tabela 1), todas foram resistentes a múltiplos princípios ativos. Segundo relatos prévios, as amostras MRSA demonstraram fenótipo de multiresistência, porém com sensibilidade à ciprofloxacina e ao sulfazotrim²⁵, diferentemente de isolados humanos²⁷ em que apenas 8,8% de MRSA foram sensíveis à ciprofloxacina. Há a possibilidade do uso de penicilinas no tratamento da mastite elevar a incidência de MRSA em vacas e a sua associação com a mastite. No presente trabalho, entre os isolados MRSA identificados pelo antibiograma e originados do leite de quartos mamários com mastite, 60% (3/5) foram resistentes ao sulfazotrim e à rifampicina, 80% (4/5) apresentaram resistência à gentamicina e todos foram resistentes à clindamicina.

A resistência estafilocócica à meticilina está associada à aquisição do cassete cromossômico *mec*, considerado uma ilha de resistência e composto pelo gene estrutural *mecA*. A sua expressão resulta na produção de PBP 2', uma proteína com alto peso molecular e baixa afinidade a antibióticos betalactâmicos¹³. Em estudo com 28 amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina, todas continham o gene *Meca*. Destas, 23 eram resistentes à eritromicina e/ou à clindamicina e em 15 destas o gene *erm* (A) estava presente, enquanto em oito detectou-se o gene *erm* (C)²⁶. Lee²⁵ relatou 17 *S. aureus* resistentes à oxacilina de um total de 265 isolados a partir do

leite bovino, em que 12 eram *meca*-positivos. Há uma concordância de 97,6% entre resultados de resistência de *S. aureus* à oxacilina, pelo teste de difusão com discos, com os resultados de PCR para o gene *Meca* e um percentual de 93,9% de amostras resistentes à oxacilina pelos testes com disco apresentaram o gene *Meca*²⁸. Porém, não é excluída a possibilidade de *S. aureus* resistentes à oxacilina pelo teste de difusão de disco, mas *Meca*-negativos, apresentarem mecanismo de resistência não mediado por *Meca*, associado com outros mecanismos. Santos et al.²⁸, por exemplo, dentre 17 amostras de *S. aureus* responsáveis por casos de mastite bovina e resistentes à oxacilina no teste de difusão, não observaram a amplificação do fragmento correspondente ao *Meca* em nenhuma. Sugeriu-se que a resistência à oxacilina decorria da hiperprodução de betalactamases e da presença do gene *fem*.

Estudos que tratam da sensibilidade a antimicrobianos de microrganismos causadores de mastite em vacas leiteiras no Brasil, apontam para o crescente aumento dos padrões de resistência, principalmente por parte de *S. aureus*. Os riscos à saúde do consumidor são evidentes, pelo uso indiscriminado de medicamentos para o tratamento da doença no animal e a possibilidade de resíduos de antimicrobianos no leite, o que pode acarretar a seleção de bactérias resistentes em humanos²⁹.

CONCLUSÕES

A escolha do medicamento a ser utilizado para o tratamento da mastite bovina por *S. aureus* deve ser feita após o conhecimento do perfil de sensibilidade dos microrganismos frente aos antimicrobianos, para ajudar na tomada de decisões e reduzir perdas na produção de leite, além de impedir o aparecimento de estirpes resistentes. O perfil de resistência à penicilina foi predominante, o que demonstra a possibilidade de ineficácia deste princípio ativo no tratamento da doença. O isolamento de estirpes resistentes à oxacilina ilustra os riscos de transmissão destes microrganismos pelo leite.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo 05/53856-3.

REFERÊNCIAS

1. Zadoks RN, Van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40 (11): 3894-3902.
2. Araújo WP. Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 1998, 35 (4): 161-165.

3. Sabour PM, Gill JJ, Lepp D, Pacan JC, Ahmed R, Dingwell R et al. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. *J Clin Microbiol.* 2004, 42 (8): 3449-3455.
4. Fagundes, H, Oliveira, CAF. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Cienc. Rural* 2004, 34 (4): 1315-1320.
5. Harmon RJ, Eberhart RJ, Jasper DE, Langlois BE, Wilson RA. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. Arlington (VA): National Mastitis Council; 1990.
6. Ingawa K, Adkinson R, Gough R. Evaluation of gel teat cleaning and sanitizing compound status of the goat udder. *J Dairy Res.* 1992, 59: 21-28.
7. McDonald J, Kinsel ML, Adams DS, Darlington R.L. Studying the effect of backflushing milking units. *Vet. Med.* 1993, 88: 382-386.
8. Holmberg O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. *Acta Vet Scand.* 1973, 45: 1-144.
9. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Gram-positive cocci. In: *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Ed. Williams e Wilkins; 1994. p. 544-551.
10. Bauer AW, Kirby WMM, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol.* 1966, 45: 493-496.
11. NCCLS. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 15th Informational Supplement 2005, 25 (1): 177p.
12. Ferreira LM, Nader Filho A, Oliveira E, Zafalon LF, Souza V. Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. *Cienc. Rural* 2006, 36 (4): 1228-1234.
13. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.*, v. 36, p. 618-623, 1998.
14. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988, 26 (11): 2465-2466.
15. Godden SM, Jansen JT, Leslie KE, Smart NL, Kelton DF. The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. *Can Vet J.* 2002, 43: 38-42.
16. Lange C, Cardoso M, Senczek D, Schwarz S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol.* 1999, 67: 127-141.
17. Costa EO, Garino Jr F, Ribeiro AR, Watanabe ET, Melville PA, Benites NR et al. Resistência aos antimicrobianos de microrganismos do gênero *Staphylococcus* isolados de mastite bovina no decênio de 1992 a 2001. *Revista Napgama.* 2004, 7 (2):13-20.
18. Vintov J, Aarestrup FM, Zinn CE, Olsen JE. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Vet Microbiol.* 2003, 95 (1-2): 133-147.
19. André MCDPB, Campos MRH, Vieira CAS, Santos PP, Borges LJ, Serafini AB. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal em laticínio de Goiás, Brasil. *Hig Aliment.* 2005, 19 (130) (encarte eletrônico).
20. Pacheco JT, Martins NE, Costa GM, Pereira UP, Silva N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de mamite bovina em Minas Gerais durante o período de 1997-2006. In: *Anais do 4º Encontro de Pesquisadores em Mastites*. Botucatu: Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007: 94.
21. Nader Filho A, Ferreira LM, Rossi Jr O, Oliveira, RP. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. In: *Anais do 9º Congresso Panamericano de Leite*. Porto Alegre, 2006: 311-315.
22. Amaral LA, Nader Filho A, Rossi Júnior OD, Penha LHC. Ação de antibióticos e quimioterápicos sobre alguns agentes bacterianos da mastite bovina, isolados da água utilizada no processo de obtenção do leite. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1996, 48 (5): 525-532.
23. Mandell G, Douglas J, Bennett R. Principles and practices of infectious diseases. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Ltd.; 1995.
24. Sol J, Sampimom OC, Noordhuizen JPTM et al. Sensitivity pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in the Netherlands from 1964 to 2001. In: *Anais do 2º Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite*. Ribeirão Preto, 2002: 116.
25. Lee JH. Methicillin (oxacillin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *App Environm Microbiol.* 2003, 69 (11): 6489-6494.
26. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2003, 41 (9): 4089-4094.
27. Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sanchez-Conde M, Sanchez-Somolinos M, et al. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. In Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004, 48 (11): 4240-4245.
28. Santos FGB, Oliveira WLM, Garino Jr F, Costa EO, Leal Balbino TC. Investigação dos mecanismos de resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina. *Revista Napgama* 2005, 8 (2):14-17.
29. Brito MAVP, Brito JRF, Silva MAS, Carmo RA. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2001, 53 (5): 10-17.

Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás

Occurrence of *Salmonella* sp. in carcasses of broilers slaughtered and marketed in cities of state of Goiás, Brazil

RIALA6/1164

Giselle do Nascimento MOREIRA^{1*}, Cíntia Silva Minafra e REZENDE², Rosângela Nunes CARVALHO², Sandra Queiroz Porto de MESQUITA², Antonio Nonato de OLIVEIRA², Marcele Louise Tadaieski ARRUDA²

* Endereço para correspondência: Rua Santo Antônio Quadra 04 Lote 10 Residencial Bela Vista. Anápolis, GO/Brasil. CEP: 75126-330. e-mail: gisanmoreira@yahoo.com.br

¹ Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO/Brasil.

² Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO/Brasil.

Recebido: 30/04/2008 – Aceito para publicação: 09/09/2008

RESUMO

Salmonella sp. é freqüentemente isolada em alimentos de origem avícola, sendo uma das principais causas de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, bem como representa risco à segurança alimentar no âmbito mundial. Por conseguinte, como forma de controle, o governo federal instaurou o monitoramento de carcaças de frangos quanto à presença do microrganismo. O presente estudo investigou a ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás-GO, Brasil. Foram analisadas 363 amostras provenientes de abatedouros inspecionados pelo serviço de fiscalização federal, no período de julho a dezembro de 2006. Empregou-se a análise bacteriológica por metodologia convencional, recomendada pela Legislação Brasileira. A presença de *Salmonella* sp. foi constatada em 52 carcaças. Foram identificados 11 sorovares e quatro fórmulas antigênicas: *Salmonella* Albany, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Saintpaul, *Salmonella* Schwarzengrund, *Salmonella* Tennessee, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Panama, *Salmonella* Muenchen, *Salmonella* Emek, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* enterica subespécie enterica 45:-:1,7, *Salmonella* enterica subespécie enterica 45:-:1,2, *Salmonella* enterica subespécie enterica 4,5:-:- e *Salmonella* enterica subespécie enterica 6,7:-:-. Observou-se a predominância de *Salmonella* Albany e verificou-se o percentual de 14,32% de amostras positivas para *Salmonella* o que indicou risco à saúde coletiva e comprometimento da segurança alimentar dos produtos e subprodutos de frangos.

Palavras-chave. carcaças, frangos, *Salmonella*, sorotipos.

ABSTRACT

The occurrence of *Salmonella* sp. in food has been a crucial topic of worldwide concern. Under this circumstances, the present study was undertaken to investigate the presence of *Salmonella* sp. In broilers young chickens slaughtered and commercialized in the State of Goiás. From July to December 2006, 363 chicken carcasses samples were collected from slaughterhouse inspected under the Federal Inspection Service. The samples were assayed by conventional bacteriological analysis, and the bacteria were isolated in 52 carcasses. Eleven sorovars and four antigenic formulas were found: *Salmonella* Albany, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Saintpaul, *Salmonella* Schwarzengrund, *Salmonella* Tennessee, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Panama, *Salmonella* Muenchen, *Salmonella* Emek, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* enterica subspecies enterica 45:-:1,7, *Salmonella* enterica subspecies enterica 45:-:1,2, *Salmonella* enterica subspecies 4,5:-:-, and *Salmonella* enterica subspecies 6,7:-:-. As 14.32% of samples were *Salmonella* sp. Positive, these findings point out a risk to the public health, and also the contaminated chicken meats and their sub-products might be a hazard for food safety.

Key words. broilers, carcasses, *Salmonella*, serotypes.

INTRODUÇÃO

A segurança alimentar engloba a manutenção e a disponibilidade de alimentos à população mundial, além de estar fortemente associada às questões do risco imputado aos alimentos que podem veicular agentes biológicos, químicos ou físicos oferecendo risco à saúde do consumidor¹.

Sob a ótica do desenvolvimento tecnológico e científico, a avicultura de corte brasileira é considerada como um dos segmentos do agronegócio nacional de maior investimento em tecnologia e pesquisa dos últimos 40 anos e esta característica reflete diretamente sobre a expansão mercadológica².

A comercialização de alimentos, sobretudo de origem animal, vincula-se às barreiras sanitárias, as quais assumiram grande importância nacional e internacional, uma vez que os países importadores evitam a entrada de produtos contaminados com patógenos em seus sistemas de produção animal e, conseqüente contaminação do consumidor, o que reforça as exigências relacionadas às relações comerciais e epidemiológicas quanto à segurança alimentar. Logo, o alto padrão sanitário da avicultura brasileira é um dos principais fatores de qualidade da carne de frango produzida em sistemas agroindustriais distribuídos, principalmente, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste.

Considerando o enfoque sanitário e comercial, pode-se salientar o gênero *Salmonella* como contaminante em alimentos de origem vegetal³, em menor escala, e de origem animal muito freqüentes em produtos lácteos^{4,5}, ovos⁶ e carnes^{7,8,9}. Especificamente aos produtos de origem aviária, as considerações epidemiológicas e de rastreabilidade fundamentam-se em questões relativas às Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) o que torna o seu controle fundamental e obrigatório¹⁰.

Em 2003, foi decretado como lei a Instrução Normativa Nº 70, de 10 de outubro, conhecido como Programa de Redução de Patógenos, Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus com o princípio básico de assegurar a garantia da qualidade, com base nos princípios de boas práticas de fabricação procedimento padrão de higiene operacional e na análise de perigos e pontos críticos de controle¹². Dentre as finalidades deste Programa, ressalta-se a sistematização de informação relacionada à pesquisa de *Salmonella*, avaliando-se a contaminação e a análise do risco biológico.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivos verificar a ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás e identificar os sorovares isolados, com o intuito de contribuir com a geração de dados para a cadeia produtiva de carne avícola e órgãos de fiscalização que monitoram o risco para saúde pública.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo fundamentou-se na pesquisa de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos no período de julho a dezembro de 2006, provenientes de cinco abatedouros

localizados em cinco municípios do estado de Goiás. Um total de 363 carcaças, destinadas ao mercado regional e externo, denotando representatividade para o período foram coletadas sob refrigeração e tempo inferior a 24 horas de abate, subsidiaram a conduta de investigação, conforme as determinações previstas pelos métodos analíticos oficiais¹¹ e o Programa de Redução de Patógenos, Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp em Carcaças de Frangos e Perus¹².

Inicialmente, de cada amostra, retirou-se 25 gramas, às quais foram adicionados 225 mL de solução salina peptonada 1% tamponada. Em seqüência, homogeneizou-se, por um minuto, e procedeu-se a incubação a 36°C, por 18 horas. Finalizado este período, 0,1 mL da solução foi inoculado em 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV) e 1mL em 10 mL de caldo Selenito Cistina (SC), com incubação a 41°C, por 24 horas. Posteriormente, uma alíquota de cada caldo foi transferida para placas de Petri contendo ágar verde brilhante com sulfato (BGS) e ágar xilose lisina tergitol 4 (XLT4). Realizou-se a semeadura em superfície por esgotamento, de forma a obter colônias isoladas. As placas foram incubadas a 35°C, por 24 horas. Após este período, três colônias suspeitas de *Salmonella*, incolores ou de cor rosada no ágar BGS e amarelas com centro negro no ágar XLT4, foram repicadas para ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e incubadas a 35°C, por 24 horas.

Os isolados que apresentaram reações típicas do gênero *Salmonella* em ágar tríplice açúcar ferro (TSI) foram submetidos a provas bioquímicas com incubação 35°C e monitorados, por um período mínimo de três a cinco dias¹¹.

As amostras sugestivas de *Salmonella* sp. foram submetidas ao teste sorológico com anti-soro polivalente "O", realizadas a partir de culturas puras com 24 horas de incubação em ágar nutriente. As suspensões das colônias foram feitas em solução salina 0,85%, esterilizada. Em lâmina de vidro, depositou-se uma gota da suspensão e uma gota do anti-soro polivalente "O", realizando-se movimentos circulares. A reação considerada positiva para *Salmonella* foi caracterizada pela presença aglutinação. Após a confirmação do gênero por meio da prova sorológica, os isolados foram inoculados em ágar nutriente e incubados a 35°C, por 24 horas.

Seguindo-se as exigências da legislação vigente^{11,12}, os isolados que apresentaram reação positiva no teste sorológico foram encaminhados em tubos devidamente identificados e lacrados, para um laboratório de referência, no caso, para o Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobactérias da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ), para realização da tipificação sorológica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 363 carcaças de frango analisadas, isolou-se *Salmonella* sp. de 52 amostras (14,32%), sendo consideradas impróprias para o consumo humano. Este resultado é semelhante àquele constatado por Nunes et al.¹³, que observaram ocorrência

de 13,2% de isolamento de *Salmonella* sp. em 53 amostras de frango coletadas em supermercados e casas de carnes, na cidade de Goiânia.

Ao comparar os dados encontrados no País, observou-se que há grande variação na frequência de isolamento de *Salmonella* sp., o que não minimiza o risco de contaminação dos alimentos. Santos et al.¹⁴ observaram um percentual de 32% de contaminação por *Salmonella* sp. em 150 carcaças de frango congeladas oriundas de abatedouros localizados no estado de São Paulo. No entanto, em Descalvado, São Paulo, Cardoso et al.¹⁵, ao analisarem 40 amostras de carcaças de frangos provenientes da indústria avícola, não observaram amostra positiva para *Salmonella* sp. Em contrapartida, também neste estado, Lírio et al.¹⁶ encontraram 77,1% de amostras de frango *in natura* positivas para o patógeno. Rezende et al.¹⁷ constataram 19,8% de positividade para este patógeno quando avaliaram 96 carcaças de frango, provenientes de abatedouros também do estado de Goiás.

A soma destes resultados reafirma a presença do patógeno nos ambientes de plantéis goianos, que na sua maioria são destinados à comercialização nacional e internacional e a necessidade de ações governamentais mais efetivas para o monitoramento e controle da contaminação deste patógeno nos plantéis avícolas e em abatedouros.

A presença de *Salmonella* sp. em aves e em seus produtos finais apontam para a possibilidade de contaminação dos estabelecimentos processadores de alimentos de origem animal, a multiplicação do agente no ambiente e a contaminação do consumidor. A preocupação atual com o controle da contaminação de alimentos por *Salmonella* sp. em alimentos pode ser associada ao fato de que esta bactéria constitui um dos principais patógenos associados à doenças causadas pelo

consumo de alimentos contaminados no mundo.

Foram isolados onze sorovares e quatro fórmulas antigênicas (Tabela 1). O sorovar predominante foi *Salmonella* Albany (25%) seguido de *Salmonella* Enteritidis (13,5%). No entanto, foram identificados 9 sorovares e 4 fórmulas antigênicas (Tabela 1).

Um dos objetivos da produção de alimentos de origem animal é a garantia da sua inocuidade. Muitos fatores predis põem a contaminação das carcaças e seus subprodutos incluindo os processos de abate e também a fase anterior aos processos, onde pode ocorrer exposição às diversas fontes de contaminação, incluindo aves contaminadas, excretas, ração e seus ingredientes, animais e humanos que estabelecem contato com as aves manejadas. É importante considerar ainda outros fatores favoráveis à contaminação dos lotes encaminhados ao abate, como a contaminação horizontal entre aves em incubatórios, nas fases de incubação ou de eclosão, incubatórios contaminados, transmissão do patógeno por via vertical, representada pelos matrizeiros de aves de corte. Estes fatores associados contribuem para a contaminação das indústrias processadoras de aves, incluindo o ambiente e os manipuladores envolvidos em todas as fases de abate, desde a chegada das aves nas plataformas de recepção até sua embalagem^{18,19,20}.

Portanto, a avaliação dos alimentos *in natura* de origem animal, quanto à sua qualidade e segurança microbiológica é um ponto importante, considerando-se que as fases de produção, preparação e armazenamento influenciarão diretamente o produto final.

Esta contextualização é ratificada com a preocupação e ação dos órgãos governamentais fiscalizadores e vigilância epidemiológica e sanitária, fundamentada na ocorrência de surtos de toxinfecção alimentar associados, em geral, a ingestão de

Tabela 1. *Salmonella* sp., frequência absoluta e frequência relativa do isolamento em carcaças de frangos abatidos em municípios do estado de Goiás, no período de julho a dezembro de 2006.

Sorovar	Frequência absoluta (%)	Frequência relativa (%)
S. Albany	13	25
S. Enteritidis	7	13,5
S. Tennessee	6	11,5
S. Saintpaul	5	9,6
S. Infantis	4	7,7
S. Mbandaka	4	7,7
S. enterica subespécie enterica 45:-:1,2	3	5,8
S. Muenchen	2	3,9
S. enterica subespécie enterica 45:-:1,7	2	3,9
S. Typhimurium	1	1,9
S. Emek	1	1,9
S. Schwarzengrund	1	1,9
S. Panama	1	1,9
S. enterica subespécie enterica 4,5:-:-	1	1,9
S. enterica subespécie enterica 6,7:-:-	1	1,9
Total	52	100

carne de frango contaminada ou à contaminação cruzada da carne e outros alimentos em cozinhas industriais ou domésticas como observados^{21,22}.

Ainda, apontando-se para as pesquisas científicas regionais, pode-se afirmar que no estado de Goiás, o sorovar *Salmonella* Albany, até então não havia sido identificado como o mais freqüente. Nunes et al.¹³ identificaram *Salmonella* Brandenburg e *Salmonella* Typhimurium como mais freqüentes em amostras de origem aviária, na cidade de Goiânia. Rocha²³ observou a predominância de 55,74% de *Salmonella* Enteritidis na mesma categoria de amostras, em Goiás. Rezende et al.¹⁷ constataram que os sorovares mais freqüentes, isolados de carcaças de frangos foram *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Livingstone.

Em outras regiões do país, estudos demonstraram que o sorovar isolado mais freqüentemente foi *Salmonella* Enteritidis de surtos, caracterizando-o como emergente, a partir da década de 1990, no país^{21,22,23,24} e em outros países^{25,26,27,28}. O resultado do presente estudo diferiu de outros quanto ao isolamento de sorovares de *Salmonella* sp. em aves comerciais, mas não menos preocupante.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, concluiu-se que apesar das práticas higiênico-sanitárias adotadas no campo, no abate e durante o processamento da carne pelas agroindústrias avaliadas, *Salmonella* sp. foi isolada em 14,32% das amostras avaliadas, o que ampara o alerta à indústria de alimentos, aos produtores de frango e às autoridades fiscalizadoras para a necessidade do controle na cadeia produtiva considerando que os produtos avícolas são destinados ao consumo humano e podem constituir um risco à saúde pública, além de serem prejudiciais às relações comerciais estabelecidas, principalmente, com Países importadores de carne avícola.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisa em Alimentos, da Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Goiás e ao Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobactérias da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, pelo auxílio.

REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira de Normas Técnicas [ABNT]. NBR ISO 22000, de 2006: sistemas de gestão da segurança de alimentos – requisitos para qualquer organização na cadeia produtiva de alimentos. Rio de Janeiro; 2006. p.35.
2. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos [ABEF]. Relatório Anual 2006. São Paulo; 2006. p. 38. Disponível: <http://www.abef.com.br>. Acesso em 01 de abril de 2008.

3. Ruschel CK, Carvalho HH, Souza RB, Tondo EC. Qualidade microbiológica e físico-química de sucos de laranja comercializados nas vias públicas de Porto Alegre/RS. Ciênc Tecnol Aliment. jan.-abr 2001; 21(1):94-7.
4. Brant LMF, Fonseca LM, Silva MCC. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro_MG. Arq Bras Med Vet Zootec. 2007; 59 (6): 1570-4.
5. Arcuri EF, Brito MAVP, Brito JRF, Pinto SM, Ângelo FF, Souza GN. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. Arq Bras Med Vet Zootec. 2006; 58 (3): 440-6.
6. Kottwitz LBM, Back A, Leão JA, Alcocer I, Karan M, Oliveira TCRM. Contaminação por *Salmonella* spp. Em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. Arq Bras Med Vet Zootec. 2008; 60 (2): 496-8.
7. Spricigo DA, Matsumoto SR, Espíndola ML, Vaz EK, Ferraz SM. Prevalência e perfil de resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de linguiças suínas tipo frescal em Lages, SC. Arq Bras Med Vet Zootec. 2008; 60 (2): 517-20.
8. Tessari ENC, Cardoso ALSP, Kanashiro AMI, Stoppa GFZ, Luciano RL, Castro AGM. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. Ciênc Rural [online]. [citado 2008-06-22]. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008005000011&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0103-8478. In press 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008005000011.
9. Alcocer I, Oliveira KMP, Vidotto MC, Oliveira TCRM. Discriminação de sorovares de *Salmonella* spp. Isolados de carcaças de frango por REP e ERIC – PCR e fagotipagem do sorovar Enteritidis. Ciênc Tecnol Aliment. abr.-jun 2006;26(2):414-20.
10. Almeida IAZC, Peresi JTM, Carvalho IS, Rodrigues ECA, Marques DF, Tavechio AT et al. *Salmonella*: sorotipos identificados na região de São José do Rio Preto/SP, no período de 1990-1999. Rev Inst Adolfo Lutz. 2000;59(1/2):33-7.
11. Brasil. Instrução Normativa Nº 62, 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.
12. Brasil. Instrução Normativa Nº 70, 10 de outubro de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 out. 2003. Seção 1, p. 9.
13. Nunes IA, Mesquita AJ, Andrade MA, Oliveira AN. Ocorrência de *Salmonella* em carcaças e cortes de frangos comercializados em Goiânia-GO. Arq Esc Vet. 1995; 25(2):1-5.
14. Santos DMS, Junior AB, Fernandes SA, Tavechio AT, Amaral LA. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. Pesq Vet Bras. 2000; 20(1):39-42.
15. Cardoso ALSP, Tessari ENC, Castro AGM, Kanashiro AMI. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frangos. Arq Inst Biol. 2000; 67(1). Disponível: http://www.biologico.br/arquivos/v.67_1/pesquisa_salmonella. Acesso em 21 de abril de 2008. ISSN 0020-3653.
16. Lírio VS, Silva EA, Stefoni S, Camargo D, Recco EAP, Maluf YT, Miyazawa TT, Neves DVDA, Oliveira VMR. Freqüência de 17 sorotipos de *Salmonella* isolados em alimentos. Hig Aliment. 1998; 12 (55): 36-42.
17. Rezende CSM, Mesquita AJ, Andrade MA, Linhares GFC, Mesquita AQ, Minafra CS. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. Rev Port Ciênc Vet. 2005; 100 (555-556): 199-203.
18. Almeida APF, Silva, EM, Almeida RCC. Contaminação e disseminação bacterianas de carcaças de frangos em abatedouros. Hig Aliment. 1993; 7(27):12-7.
19. Hofer E, Silva Filho SJ, Reis EMF. Sorovares de *Salmonella* isolados de matrizes-primas e de ração para aves no Brasil. Pesq Vet Bras. 1998;18(1):21-2.

20. Rocha PT, Mesquita AJ, Andrade, MA, Louly PR, Nascimento MN. *Salmonella* spp. em forros de caixa de transporte e órgãos de pintos de um dia. *Arq Bras Med Vet Zootec*.2003; 55(6): 672-6.
21. Kaku M, Peresi JTM, Tavechio AT, Fernandes AS, Batista AB, Castanheira IAZ, Garcia GMP, Irino K, Gelli DS. Surto alimentar por *Salmonella enteritidis* no noroeste do estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publ*.1995;29(2):127-31.
22. Peresi JTM, Almeida IAZC, Lima SI, Marques DF, Rodrigues ECA, Fernandes AS, Gelli DS, Irino K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. *Rev Saude Publ*. 1998;32(5):477-83.
23. Rocha PT. Ocorrência de *Salmonella* spp. em granjas de integrações de frangos de corte no Estado de Goiás. [Dissertação de Mestrado]. Goiânia, GO: Universidade Federal de Goiás, 2001. 57p.
24. Tavechio AT, Fernandes SA, Neves BC, Dias AM, Irino K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 1996;38(5):315-22.
25. Suzuki S. Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in poultry. *Int J Food Microbiol*. 1994; 21: 89-105.
26. Limawongpranee S, Hayashidani H, Okatani AT, Ono K, Hirota C, Kaneko K, Ogawa M. Prevalence and persistence of *Salmonella* in broiler chicken flocks. *J Vet Med Sci*. 1998; 61(3):255-9.
27. Corrier DE, Byrd JA, Hargis BM, Hume ME, Bailey RH, Stanker LH. Presence of *Salmonella* in crop and ceca of broiler chickens before and after preslaughter feed withdrawal. *Poultry Science*. 1999; 78: 45-9.
28. Chang YH. Prevalence of *Salmonella* spp. in poultry broilers and shell eggs in Korea. *J Food Prot*. 2000; 63(5):655-58.

Nanoformulations of pentavalent antimony entrapped in phosphatidylserine-liposomes demonstrate highest efficacy against Experimental Visceral Leishmaniasis

Nanoformulações de antimônio pentavalente encapsuladas em lipossomos contendo fosfatidilserina demonstram maior eficácia contra Leishmaniose Visceral experimental

RIALA6/1165

André Gustavo TEMPONE^{1*}, Heitor Franco de ANDRADE JR.²

*Corresponding author: ¹Instituto Adolfo Lutz, Serviço de Parasitologia, Laboratório de Toxinologia Aplicada, Av. Dr. Arnaldo 355, 8º andar, CEP 01246-000 São Paulo, SP/Brazil, Phone:55+11+3068-2991, Fax. 55+11+3068-2890, e-mail: atempone@ial.sp.gov.br/ atempone@usp.br

² Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, Laboratório de Protozoologia, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, CEP 05304-000, São Paulo, SP/Brazil.

Recebido: 07/07/2008 – Aceito para publicação: 15/08/2008

ABSTRACT

Leishmaniasis is an endemic and tropical disease that afflicts mainly the developing countries. The limited and highly toxic therapeutic arsenal for leishmaniasis treatment still remains on antimony salts. The second line drugs as amphotericin B and pentamidine are also toxic, and no novel drug is available against *Leishmania* spp. Liposomes are effective drug delivery systems which can deliver high amounts of entrapped drugs to target cells. In this study, a strategic liposome formulation was developed in order to deliver the pentavalent antimony to *Leishmania*-infected macrophages through the *in vivo* interaction with scavenger receptors. Antimony-entrapped liposomes demonstrated a high efficacy *in vivo* reducing 133-fold the total antimony dose, with a 100% decrease in the liver parasite burden at 0.75 mg/kg dose. By transmission electron microscopy a stable formulation composed by oligolamellar vesicles with 0.2 µm was demonstrated. Zeta potential studies showed a negative charge attached to the external membrane of liposomes due to phosphatidylserine addition. This novel approach contributes to the study on novel liposomal formulations for reducing the toxic effects of drugs in Leishmaniasis therapy.

Key words. leishmania, therapy, liposomes, phosphatidylserine, antimony, nanoformulations.

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença tropical endêmica que afeta principalmente países em desenvolvimento. O arsenal terapêutico da Leishmaniose é muito restrito e altamente tóxico, tendo como base o uso dos sais de antimônio. Os fármacos de segunda escolha como a anfotericina B e a pentamidina também apresentam elevada toxicidade e, assim, nenhuma terapia recente é efetiva contra *Leishmania* spp. Lipossomos são sistemas carreadores de fármacos, que podem direcionar altas doses a células alvo. No presente trabalho foi desenvolvida uma nova formulação lipossomal com o objetivo de direcionar o antimônio pentavalente aos macrófagos infectados com *Leishmania* (*L.*) *chagasi*, por meio da interação com receptores *scavengers in vivo*. A formulação de antimônio lipossomal demonstrou elevada eficácia *in vivo*, reduzindo 133 vezes a dose total de antimônio administrada, com diminuição de 100% da carga parasitária do fígado na dose de 0,75 mg/kg. Estudos em microscopia eletrônica de transmissão revelaram uma formulação estável e de aspecto oligolamelar. Estudos do potencial zeta demonstraram carga negativa acoplada à superfície dos lipossomos, derivada da adição de fosfatidilserina. Esta nova abordagem vem contribuir no estudo de novas formulações lipossomais para redução da toxicidade de fármacos no tratamento da Leishmaniose.

Palavras-chaves. Leishmania, terapia, lipossomos, fosfatidilserina, antimônio, nanoformulações.

INTRODUCTION

Neglected diseases, as Leishmaniasis, affect the poorest population in developing countries. The visceral form of Leishmaniasis (VL) is a progressive and fatal hepatosplenomegaly with 500 million cases/year. No effective drug exists if one considers the high toxicity of the current treatment¹. Antimonial salts still remain as first-line drugs since 1912, when the Brazilian researcher, Gaspar O. Vianna, reported the efficacy of the trivalent salt of antimony² against Cutaneous Leishmaniasis. Pentamidine and amphotericin B have been used as second line drugs, but the toxicity has also been a limiting feature for many patients³. Miltefosine, an oral anticancer drug, has been reached clinical phase IV in India against *Leishmania donovani*⁴, but in South-America, this drug failed to treat other *Leishmania* species⁵. New drugs and novel therapeutical approaches for Leishmaniasis are urgent.

The use of drug delivery systems for selective targeting has been the main goal of therapy of highly toxic drugs. Liposomes are vesicles composed of lipid layers that enclose an aqueous and lipid compartments that entrap drugs of different lipophilicities. They offer a substantial improvement in the therapeutic indices of entrapped drugs⁶. The first commercial liposomal forms in the market were AmBisome™ (amphotericin B), DaunoXome (daunorubicin citrate), and Doxil (doxorubicin)⁷. Ambisome have been used for Leishmaniasis therapy with an excellent efficacy against many parasite strains, but the high costs for a single treatment limits the use in developing countries. Despite the inconvenient, the costs of hospitalization and laboratorial surveillance during treatment, may overcome the high costs of liposomal amphotericin B¹.

Macrophages, the host cell for *Leishmania* spp., are phagocytic cells which participate in the immune defense system through the recognition and elimination of pathogens and also self senescent cells. Macrophages clearly discriminate between apoptotic cells and viable cells, through the recognition of the different phospholipid asymmetry and exposure of phosphatidylserine in plasma membrane of senescent cells⁸. Based in this study, Tempone and co-workers⁹, showed a high *in vitro* efficacy of antimony entrapped in phosphatidylserine-liposomes against *Leishmania*-infected macrophages and also demonstrated its targeting ability to macrophage scavenger receptors. In this work, we have studied the *in vivo* efficacy of this novel formulation of antimony-entrapped liposomes, using mice models against VL. We have also characterized the liposomal formulation through transmission electron microscopy and its membrane surface charge, by using ζ potential studies.

MATERIAL AND METHODS

Materials lipids

Hydrogenated phosphatidylcholine and phosphatidylserine were kindly donated by Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany.

Glycerol, dodecyl sodium sulphate, methanol and chloroform were purchased from Merck. RPMI-PR-1640 medium (without phenol red) were purchased from Sigma. Glucantime was obtained from Aventis.

Animals and parasites

L. (L.) chagasi (MHOM/BR/1972/LD) was maintained in Golden Hamsters. Amastigotes were obtained from the spleen by differential centrifugation and the parasite burden determined with the method of Stauber¹⁰, at 60-70th day post infection. Animals were supplied by the Animal Breeding Facility at the Faculty of Medicine of São Paulo and maintained in sterilized cages with absorbent environment, receiving water and diet *ad libitum*. Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) were infected every two months by i.p. injection with *L. (L.) chagasi* in order to obtain amastigotes. Animal procedures were performed according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Academy of Sciences (<http://www.nap.edu>).

Liposomes

Liposomes were prepared as described elsewhere⁹. Liposomes were composed of saturated egg phosphatidylcholine, phosphatidylserine and cholesterol (5:1:4 molar ratio). Briefly, the lipids were mixed in chloroform-methanol (1:1 v/v) solution, dried at 55°C by rotary evaporation. Pentavalent antimony was added at 55°C and mixed with lipids for 1h. After vesicle rehydration, the solution was sonicated for 5 min in a sonicating bath, under a stream of nitrogen at 55°C and extruded through 0.2 μ m pore size polycarbonate membranes using a mini-extruder device (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster). The removal of non-encapsulated drug was carried out by 24h dialysis against an isotonic glycerol solution and the sterilization of the liposomal formulation was done with 0.22 μ m membranes prior to use. The final phospholipid concentration was determined by the Stewart Assay¹¹ and resulted in 69mg/mL of phospholipids. The concentration of encapsulated antimony was determined in an Atomic Absorption Spectrophotometer- Hydrate Generation (Intralab GeminiAA12/1475) at $\lambda = 217.6$ nm, after liposomes lyses with 0.1 % SDS and resulted in 6.92 mg Sb^v/mL (final volume of 2mL).

Characterization of liposomes

Transmission Electron Microscopy- In order to determine the mean diameter of liposomes after antimony entrapment, an aliquot of the material was fixed in the microscopy grid, stained with 1% phosphotungstic acid for 2min and observed in a transmission electron microscopy – JEOL¹².

Determination of the membrane surface charge

The zeta potential (mV) of liposomes was determined using an aliquot of the material dissolved in 3M KCl. The equipment used for this assay was a Zeta Potential Analyzer – Zeta Plus (BrookHaven Instr. Corp.) - conductivity - 263 μ S,

electric chain - 1,54mA¹³. Liposomes free of surface charge and antimony (phosphatidylcholine/cholesterol – 6:4 molar ratio) were used as internal controls.

In Vivo treatment with antimony-entrapped liposomes

The *in vivo* efficacy of antimony-entrapped liposomes was determined using female BALB/c mice (18 - 22g), which was previously infected (tail vein) with *L. (L.) chagasi* amastigotes. Briefly, spleen isolated amastigotes were intravenously inoculated at 2×10^7 amastigotes/mouse, using groups of 5 animals¹⁴. Seven days after the infection, mice were intraperitoneally treated with antimony-entrapped liposomes in a range dose between 0.75 to 75mg/kg, and compared with free-antimony (non-liposomal formulation) in a range dose between 1 to 100mg/kg. The treatment was administered for 4 consecutive days and 14 days post infection, animals were sacrificed and spleen/liver infection analyzed using Giemsa stained imprints by light microscopy. Both organs were weighted and compared with untreated group (infected group). The number of amastigotes per 500 liver cell nuclei was determined and multiplied by the liver weight in mg to obtain Leishman Donovan Units (LDUs)¹⁵. Liposomes were developed prior to each inoculum and empty-liposomes (free of antimony) were developed as control.

Statistical analysis

Data represents the means (\pm S.D.) from duplicate independent assays. Data were obtained using Graph Pad Prism 3.0 software.

RESULTS AND DISCUSSION

The present data clearly demonstrated an improvement in the treatment of *L. (L.) chagasi*-infected mice by the pentavalent antimony entrapped in phosphatidylserine-liposomes. The formulation of liposomes entrapping the pentavalent antimony was evaluated under *in vivo* conditions, using BALB/c mice previously infected with *L. (L.) chagasi*. All treated groups showed 100% reduction in the number of liver amastigotes, even at doses of 0.75mg/kg (Figure 1). In contrast, free-pentavalent antimony showed only a 56 % reduction in parasite burden at 1mg/kg. Free-antimony presented a dose-dependent suppressive effect, with 100% reduction of liver parasite burden only at the highest tested doses (100mg/kg).

This liposomal formulation fulfilled most of the requirements for an efficient drug delivery system. Essentially, two primordial requisites should be considered: it should protect the drug from degradation in the blood environment and should

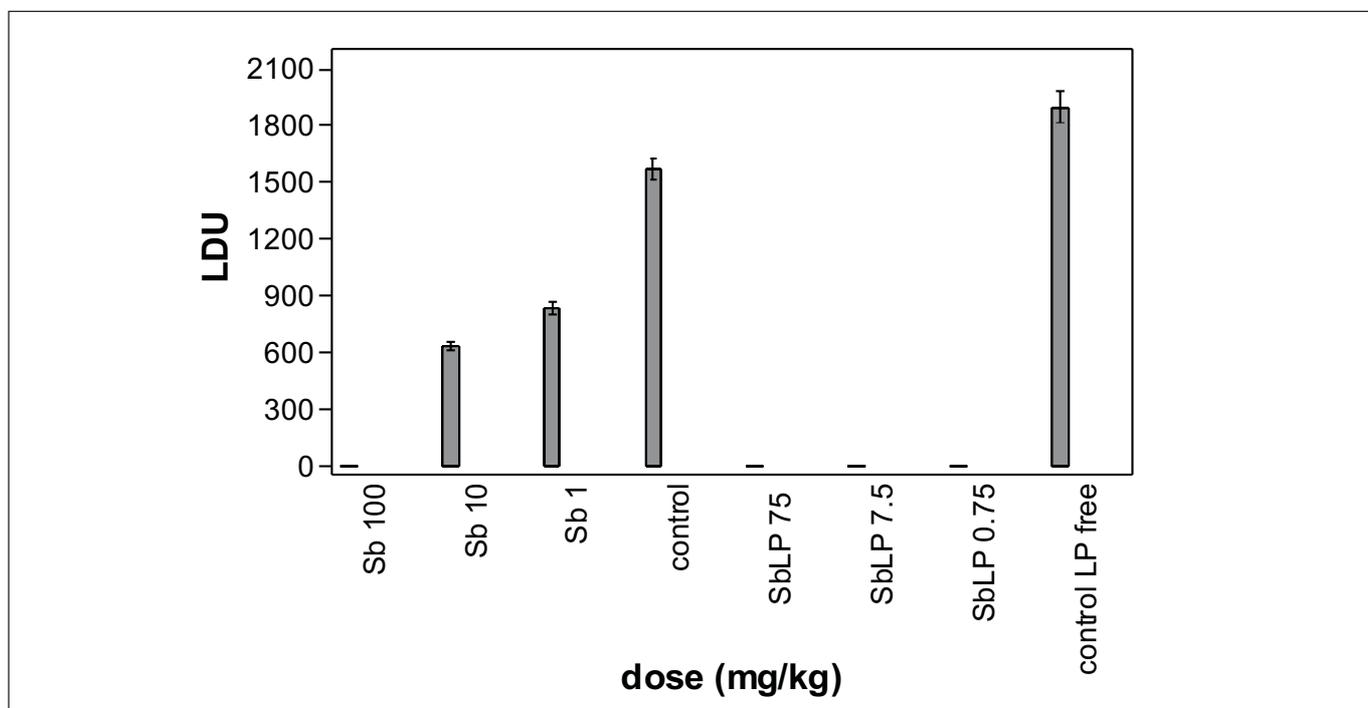


Figure 1. *In vivo* treatment of BALB/c mice infected with *L. (L.) chagasi* with free antimony (Sb) at 100, 10 and 1mg/kg, and antimony-entrapped liposomes (SbLP) at 75, 7.5 and 0.75mg/kg. Parasite burden was determined as Leishman Donovan Units (LDU). Groups without treatment (control) and treated with free-antimony liposomes (control LP) were used as controls.

enhance the drug uptake by the targeted cells, making the new formulation a cost-effective procedure¹⁶. In our previous data, a high *in vitro* efficacy (16-fold higher than free-antimony) of antimony-entrapped liposomes was demonstrated in *L. (L.) chagasi*-infected macrophages, with a particular interaction with macrophage scavenger receptors⁹. Our present experimental *in vivo* assay, confirmed the high efficacy of the phosphatidylserine liposomes, since at doses of 0.75mg Sb⁵/kg, 100% reduction of liver parasite burden was observed. In contrast, free pentavalent antimony resulted in the same efficacy only at doses 133-fold higher than those used with antimony-entrapped liposomes. New and co-workers¹⁶ showed a significant efficacy of antimony-entrapped in non-charged liposomes using mice models, with 61 % reduction of the parasite burden at 5 mg Sb⁵/kg. The marked difference between phosphatidylserine liposomes (PS-liposomes) and other conventional formulations could be explained by the differential pharmacokinetic of negatively-charged formulations¹⁷. Cationic liposomes have also been showed a superior efficacy in VL models when compared to free antimony. Pal and co-workers¹⁸, have been demonstrated an efficient treatment of VL (*Leishmania donovani*) using single dose regimen with a non-extruded cationic formulation. Despite the considerable divergences in how surface charge of liposomes contribute to the *in vivo* interaction with macrophages, our previous work clearly demonstrated that the *in vitro* attachment of negatively-charged liposomes to macrophages is highly dependent on the interaction with scavenger receptors, resulting in a high *in vitro* and *in vivo* therapeutic improvement against *L. (L.) chagasi*⁹. Furthermore, a confocal microscopy study of fluorescent PS-liposomes suggested an intra-parasitophorous vacuole delivery, probably triggered by the interaction with annexins⁹.

In VL therapy, the major difficulty is related to the considerable adverse effects caused by high doses of antimony¹. The use of drugs entrapped in liposomes could significantly modify the drug pharmacokinetics, reducing the total amount of the administered drug. Additionally, it could enhance the Therapeutic Index of a drug by a reduced toxicity¹⁹. However, it is known that the chronic or acute phase of the disease could also contribute to a differential pharmacokinetics of a tested formulation²⁰. Our data demonstrated a better efficacy of the liposomal formulation at the acute phase of VL. The study of chronic infections in experimental VL and the use of different treatment regimens could be an important tool for additional evaluation of this promising therapeutic approach.

In this work, it was evident that the treatment with high doses (75 mg/kg) of antimony-entrapped liposomes resulted in increased spleen and liver weights (data not shown), suggesting a possible toxicity. Despite this inconvenient, antimony-entrapped liposomes demonstrated a 100% reduction of parasite burden at 0.75 mg Sb⁵/kg, with significant reduction of liver and spleen masses (compared to untreated group). These results demonstrate that small doses of the liposomal formulation could be adequate for the treatment, avoiding the usual high dose

regimens. Hunter and co-workers¹⁷ observed a suppressive effect on *Leishmania (L.) donovani*-infected mice using unloaded neutral liposomes (without drugs), suggesting an antiparasitic effect of the lipid formulation. Pal et al¹⁸ have also demonstrated this same effect using unloaded cationic liposomes. Our results with unloaded liposomes (without antimony – used as internal control), demonstrated no interference in the parasite burden.

The physical chemical characteristics of liposome formulations could strongly influence the targetability in living organism, and also determine the liposome efficacy. Surface charge, size and membrane fluidity are the major features⁷. The phase transition temperature (T_c) of lipids is an important aspect when one considers the cellular membrane interaction. At 37°C saturated lipids present a gel-state, conferring a superior cellular interaction with liposomes, when compared to other formulations using lipids of low phase-transition temperatures²¹. Thus, the strategic use of saturated lipids in our liposome formulation, besides promoting a protection against oxidative damages²² and higher drug retention²³, might have also contributed to the observed efficacy.

The transmission electron microscopy of liposomes showed a medium diameter of 210 nm, with an oligolamellar aspect (Figure 2). Liposomes of different sizes have been

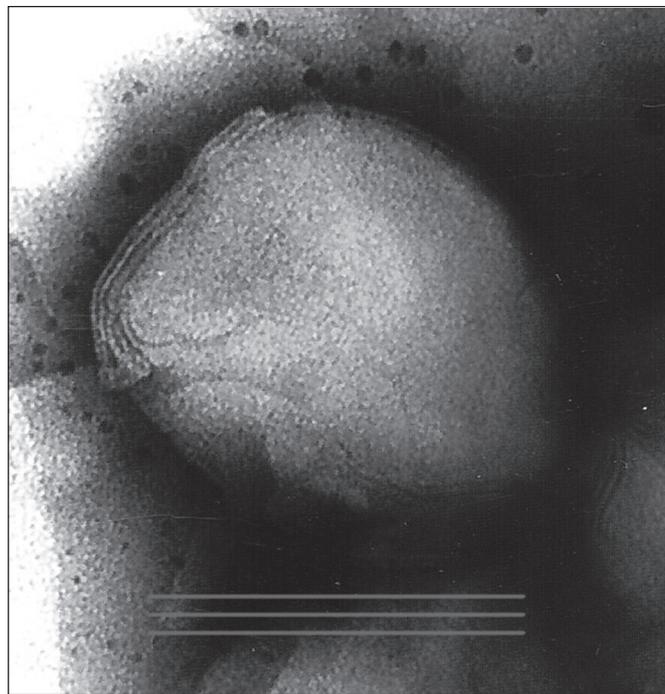


Figura 2. Electron transmission microscopy of pentavalent antimony entrapped into PS-liposomes. Negative staining using phosphotungstic acid. Bar= 200nm.

demonstrated diverse targetability to liver sites²⁴. Carter and co-workers²⁵ have demonstrated a high efficacy of antimony-entrapped liposomes through size reduction from 850 nm to 116 nm, using neutral liposomes composed by L- α -phosphatidylcholine and cholesterol (7:3 molar ratio).

The surface charge of our PS-liposomes was determined by the ζ potential of the formulation and resulted in -88.0 mV (± 20). Liposomes composed of neutral phospholipids were used as control and showed a ζ potential of + 1.25mV ($\pm 0,2$). The membrane charge of liposomes is an essential characteristic for liposome-cell interaction. In addition, negatively-charged liposomes have been shown higher blood stability when compared to positively-charged formulations, as a consequence of a diminished adherence of serum proteins to liposome surfaces²⁶. The determination of ζ potential of our PS-liposomes suggested a negative charge at the external liposome membrane, as a result of intentional addition of phosphatidylserine. Our previous *in vitro* data have clearly demonstrated that this feature contributed to a high interaction of liposomes with macrophage scavenger receptors⁹. According to Fadok and co-workers²⁷, ScavR are the major binding sites for PS-liposomes, as a consequence of the regular apoptotic clearance of senescent cells by macrophages. Besides the usual presence of ScavR in macrophage membranes, a high expression of CD36 and SR-BI has been demonstrated in *Leishmania*-infected macrophages⁹. This fact might also have contributed to the superior efficacy of our formulations.

Besides the elevated toxicity of antimonials, no novel drug fulfilled all requirements for the effective replacement of this old treatment, and consequently, this drug is still used as a first-choice therapy in the majority of endemic countries. The possible reduction of the high adverse effects of antimony therapy as a result of a diminished dose regimen and a consequent reduction of the treatment period may surpass the high costs of an antimony liposomal formulation against Visceral Leishmaniasis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. Suzane Rath (Unicamp) for pentavalent antimony quantification in liposomes. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (99/08491-4) and LIM-49 FMUSP.

REFERENCES

1. Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson ADM. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*. 2002; 2: 494-01.

2. Vianna GO. Tratamento da Leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético. *An 7º Congr Bras Med Cirurg*. 1912; 4: 426-28.
3. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*. 2003;19:502-8.
4. Dube A, Singh N, Sundar S, Singh N. Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kala-azar field isolates persist in *in vitro* and *in vivo* experimental models. *Parasitol Res*. 2005; 96: 216-23.
5. Soto J, Berman J. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100:34-40.
6. Gulati M, Grover M, Singh S, Singh M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. *Int J Pharm*. 1998; 165: 129-68.
7. Sharma A, Sharm US. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int J Pharm*. 1997;154:123-40.
8. Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L, Henson PM. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol*. 2001; 166: 6847-54.
9. Tempone AG, Perez D, Rath S, Vilarinho AL, Mortara RA, Andrade Jr HF. Targeting *Leishmania* (L.) *chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:60-8.
10. Stauber LA, Franchino EM, Grun, J. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in golden hamsters. *J Protozool*. 1958; 5, 269-73.
11. Stewart JCM. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrioxalate. *Anal Biochem*. 1980; 104:10-4.
12. New RRC. Liposomes: a practical approach. University Press, Oxford, 1992; p. 140-45.
13. Ciani L, Ristori S, Salvati A, Calamai L, Martini G. DOTAP/DOPE and DC-Chol/DOPE lipoplexes for gene delivery: zeta potential measurements and electron spin resonance spectra. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1664: 70-9.
14. Garnier T, Mäntylä A, Järvinen T, Lawrence J, Brown M, Croft S. *In vivo* studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60:802-10.
15. Bradley DJ, Kirkley J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. I. The variable course of *Leishmania donovani* infections in mice. *Clin Exp Immunol*. 1977;30: 119-29.
16. New RR, Chance ML, Thomas SC, Peters W. Antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes. *Nature*. 1978; 2:55-6.
17. Hunter CA, Dolan TF, Coombs GH, Baillie AJ. Vesicular systems (niosomes and liposomes) for delivery of sodium stibogluconate in experimental murine visceral leishmaniasis. *J Pharm Pharmacol*. 1988; 40:161-5.
18. Pal S, Ravindran R, Ali N. Combination therapy using sodium antimony gluconate in stearylamine-bearing liposomes against established and chronic *Leishmania donovani* infection in BALB/c Mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:3591-3.
19. Collins M, Carter KC, Baillie AJ. Visceral leishmaniasis in the BALB/c mouse: antimony tissue disposition and parasite suppression after the administration of free stibogluconate. *Ann Trop Med Parasitol*. 1992;86:35-40.
20. Baillie AJ, Dolan TF, Alexander J, Carter KC. Visceral leishmaniasis in BALB/c mouse: sodium stibogluconate treatment during acute and chronic stages of infection. *Int J Pharm*. 1989;57:23-8.
21. Szoka F, Jacobson K, Derzko Z, Papahadjopoulos D. Fluorescence studies on the mechanism of liposome-cell interactions *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*. 1980; 600: 1-18.
22. Zuidam NJ, Lee SS, Crommelin DJ. Sterilization of liposomes by heat treatment. *Pharm Res*. 1993;10:1591-6.
23. Kokkona M, Kallinteri P, Fatouros D, Antimisariis SG. Stability of SUV liposomes in the presence of cholate salts and pancreatic lipases: effect of lipid composition. *Eur J Pharm Sci*. 2000;9:245-52.

24. Abra RM, Hunt CA. Liposome disposition *in vivo* IV: the interaction of sequential doses of liposomes having different diameters. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1982;36:17-31.
25. Carter KC, Dolan TF, Alexander J, Baillie AJ, McColgan C. Visceral leishmaniasis: drug carrier system characteristics and the ability to clear parasites from the liver, spleen and bone marrow in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice. *J Pharm Pharmacol*. 1989; 41:87-91.
26. Oku N, Tokudome Y, Namba Y, Saito N, Endo M, Hasegawa Y, Kawai M, Tsukada H, Okada S. Effect of serum protein binding on real-time trafficking of liposomes with different charges analyzed by positron emission tomography. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1280:149-54.
27. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*. 2000; 405: 85-90.

Ocorrência de *Cryptococcus* spp e de parasitas de interesse em saúde pública, nos excretas de pombos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

Occurrence of *Cryptococcus* spp and parasites of interest in public health in pigeons excrement in the city of Ribeirão Preto, SP, Brazil

RIALA6/1166

Jaqueline Otero SILVA^{*1}, Divani Maria CAPUANO²

* Endereço para correspondência: ¹Instituto Lutz, Laboratório I Ribeirão Preto, Rua Minas, 877, CEP 14085-410, Ribeirão Preto, SP/Brasil, Telefone: (0xx) 16-36255046, Fax: (0xx) 16-36357994, e-mail: jaquelineos@ig.com.br ou jqsilva@ial.sp.gov.br

² Instituto Adolfo Lutz de Taubaté, SP/Brasil

Recebido: 31/03/2008 – Aceito para publicação: 12/06/2008

RESUMO

Os pombos têm sido considerados reservatórios de agentes infecciosos de importância em saúde pública. A deposição de excretas em áreas públicas pode contaminar o meio ambiente e produtos alimentícios. O objetivo deste estudo foi pesquisar a ocorrência de *Cryptococcus* spp e parasitas em amostras de excretas de pombos. Entre janeiro a setembro de 2006 foram coletadas 68 amostras de “pools” de excretas depositadas em quatro áreas públicas de Ribeirão Preto, SP. Para pesquisa de *Cryptococcus* spp, suspensões de cada amostra em solução salina contendo cloranfenicol foram semeadas em Agar Sabouraud Dextrose (ASD) acrescido de cloranfenicol com posterior incubação a 30°C e observação diária por sete dias. As colônias sugestivas de *Cryptococcus* spp foram repicadas em ASD para identificação fenotípica. Para pesquisa de parasitas, as técnicas de sedimentação espontânea e centrífugo-flutuação em sulfato de zinco e de coccídeos, as técnicas de concentração pelo formol-éter e coloração de Ziehl-Neelsen modificado. Foram encontrados *Cryptococcus* spp em 75% das amostras, parasitas em 32% e a presença concomitante de ambos agentes patogênicos em 25% das amostras. Ressalta-se a necessidade da adoção de medidas efetivas de proteção de áreas públicas, por meio de redução da população de pombos para evitar a contaminação ambiental.

Palavras-chave. pombos, *Cryptococcus* spp, parasitas intestinais.

ABSTRACT

Pigeons have been considered the reservoirs for infectious agents of public health concern. The deposition of their excreta in public areas can cause environmental contamination, including the food products for human consumption. The purpose of the present study was to investigate the occurrence of *Cryptococcus* spp and parasites in pigeon excrements. From January to September 2006, sixty eight pools of excreta samples were collected from four public areas of Ribeirão Preto, SP. For detecting *Cryptococcus* spp, each sample was suspended in saline solution with chloramphenicol, and then cultured on Sabouraud Dextrose Agar plates (SDA) supplemented with chloramphenicol. The cultures were incubated at 30°C and daily observed for seven days. *Cryptococcus* spp-suggestive colonies were streaked on SDA medium for phenotypic identification. For searching the parasites the spontaneous sedimentation and centrifugal-fluctuation in zinc sulfate techniques were carried out. Coccidian oocysts were investigated by formalin-ether concentration and modified Ziehl-Neelsen staining techniques. *Cryptococcus* spp was found in 75%, and parasites in 32% of the samples, and the concomitant presence of both pathogens has occurred in 25% of total samples. It is emphasized the establishment of strategies for preserving the public areas by reducing the pigeons populations, in order to avoid environment contamination.

Key words. pigeons, *Cryptococcus* sp, parasites.

INTRODUÇÃO

As aves domésticas como os pombos urbanos têm sido considerados reservatórios de agentes infecciosos de importância em saúde pública^{1,2,3}. Do ponto de vista epidemiológico, os pombos têm um papel importante na contaminação do meio ambiente e na dispersão de patógenos através da deposição de seus excretas. O comportamento de freqüentes e intensas aproximações à população, devido à busca de alimento e abrigo, contribui para a transmissão humana de agentes patogênicos, como fungos e parasitos^{1,2,3,4}. Paralelamente, o hábito de pessoas alimentá-las em praças e outros locais públicos, favorece a proliferação desordenada das mesmas, aumentando a chance da contaminação ambiental e da transmissão de doenças. Nas cidades os pombos alimentam-se preferencialmente de restos de alimentos jogados na rua, mas podem também se alimentar de restos de lixo, o que possibilita aos mesmos atuarem como vetores para a transmissão de patógenos². O homem pode se infectar pela via respiratória, aspirando poeira de locais contaminados por fezes secas ou pela ingestão de poeira e/ou alimentos contaminados com os excretas destas aves. Este estudo tem como objetivos pesquisar a ocorrência do *Cryptococcus* spp e de parasitos de interesse em saúde pública, em amostras de excretas de pombos coletados em áreas públicas do município de Ribeirão Preto, SP, enfatizando o risco de infecção humana.

MATERIAL E MÉTODOS

Área geográfica de estudo

Ribeirão Preto situa-se a 313 Km a noroeste da capital estadual. Seu território de 642 km² abriga uma população estimada para 2007, segundo o SEADE, de 557 mil habitantes, que faz do município o nono mais populoso do estado. É sede de uma das principais praças financeiras do país e um dos maiores centros comerciais do estado de São Paulo⁵.

Locais de coleta

Os locais escolhidos para a coleta dos excretas foram áreas públicas com grande presença de pombos e intensa movimentação de pessoas e/ou de comércio de alimentos:

- Praça das Bandeiras, situada na região central do município, onde localiza-se a Catedral Metropolitana. Ao redor da praça existem estabelecimentos comerciais, pontos de ônibus e de táxi. No quarteirão em frente à catedral ocorre todos os finais de semana a Feira de Artes e Artesanato onde são também comercializados alimentos, sendo visível uma grande presença de excretas de pombos sobre a lona que cobre as barracas.

- Praça Coração de Maria, localizada na Vila Tibério, região leste do município. Ao redor da praça há igreja, escola estadual, sorveteria, pontos de ônibus e de táxi e alguns prédios comerciais. Há também a presença de vendedores ambulantes de alimentos. Esta região propicia abrigo e nidificação para estas aves.

- Terminal Rodoviário, situado no centro da cidade com presença de estabelecimentos comerciais, incluindo de alimentos além de pontos de ônibus e de táxi. Em frente e ao redor do terminal existem várias árvores que servem de abrigo para os pombos. O mercado municipal da cidade também é próximo do terminal.

Período e Coleta das Amostras

Foram coletadas no período de janeiro a setembro de 2006 68 de amostras de "pools" de fezes de pombos, assim distribuídos: 43 na Praça das Bandeiras sendo 34 na Feira de Artes e Artesanato e 9 nas imediações da Catedral Metropolitana, 15 na praça Coração de Maria e 10 no Terminal Rodoviário.

As amostras foram coletadas em potes plásticos esterilizados através da raspagem com espátulas. As fezes estavam depositadas em locais como bancos, grades, telefones públicos, lonas das barracas de alimentos, coberturas de ponto de ônibus, chão de cimento, entre outros.

Processamento das Amostras

No Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto o material foi processado em Cabine de Segurança Biológica Classe II Tipo A em menos de 24 horas após a coleta. As fezes foram maceradas em graal com pistilo previamente esterilizados até adquirir um aspecto homogêneo, para facilitar a diluição da mesma.

Pesquisa de *Cryptococcus* spp

Aproximadamente 1 grama do material foi colocado em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 125ml e adicionado de 50 mL de solução fisiológica a 0,9% esterilizada contendo 0,4g/L de cloranfenicol. Após agitação em vortex por três minutos e repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, volumes de 10µL, 100µL, 200µL e 500µL, foram semeados em placas de Agar Sabouraud Dextrose acrescido de 0,05g/L de cloranfenicol. Incubou-se a 30°C por até 7 dias, sendo que as leituras foram realizadas a partir do segundo dia⁶. Colônias de aspecto brilhante, cor branca a bege foram repicadas em Agar Sabouraud Dextrose e incubadas à 30°C por um período de 48 horas. A partir delas, foram realizadas preparações com tinta da China e lactofenol azul de algodão e prova da urease. As leveduras urease positivas foram identificadas por provas de fenoloxidase e auxanograma⁷.

Pesquisa de Parasitos

Aproximadamente 2 gramas de fezes maceradas foram processadas pelos métodos da sedimentação espontânea e da centrifugo-flutuação em sulfato de zinco a 33% com densidade 1.180. Após sedimentação por 12 horas, parte do sedimento foi colocado em lâmina de vidro, adicionado lugol e examinado em microscopia de luz. O material sobrenadante obtido pela centrifugo-flutuação foi imediatamente examinado entre lâmina e lamínula, adicionando-se uma gota de lugol em microscópio óptico. Para a pesquisa de coccídeos foi utilizada a técnica de concentração pelo formol-éter modificado, seguido de coloração

dos esfregaços pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada⁸. Os esfregaço corados foram observados em microscopia de imersão.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL) em 10 de janeiro de 2006. Projeto CCD/LR n. 27/05

RESULTADOS

Foram encontrados *Cryptococcus* sp em 75% das amostras (n =51), parasitos em 32% (n =22) e a presença simultânea dos mesmos em 25% (n=17) (Tabela 1). Entre os isolados de *Cryptococcus* foram identificados *C. laurentii* (n=43), *C. unigutulatus* (n=3), *C. laurentii* associado com *C. albidus* (n=4) e *C. unigutulatus* associado com *C. laurentii* (n=1).

Os parasitos encontrados foram: larvas e ovos de ancilostomídeos (n=7), oocistos de coccídios (n=5), cistos de *Entamoeba* spp (n=5), ovos de *Ascaris* spp (n=4), cistos de *Giardia* spp (n=2) e larvas de nematóides (n=3). A ocorrência simultânea de dois parasitos diferentes ocorreu em 3 amostras de “pools”: *Ascaris* spp e coccídeos, ancilostomídeos e coccídeos e *Entamoeba* spp e ancilostomídeos.

A positividade das amostras em relação aos locais de coleta foi de 100% na Catedral Metropolitana, 91% na Feira de Artes e Artesanato, 73% na praça Coração de Maria e 40% no Terminal Rodoviário. Salienta-se que em todas as amostras obtidas das lonas das 4 barracas de alimentos (garapa, coco verde e salgados) da Feira de Artes e Artesanato foram observados *Cryptococcus* spp e/ou parasitos.

DISCUSSÃO

As fontes ambientais de *C. neoformans* são bastante diversificadas e estão relacionadas a alguns substratos orgânicos, entre eles excretas de aves e vegetais. *Cryptococcus neoformans* tem a capacidade de colonizar a mucosa do papo dos pombos sem causar doença, sendo parasita natural dessas aves. Esta espécie é o principal agente etiológico da criptococose, doença considerada, por alguns autores, como uma infecção fatal que pode ser transmissível ao homem nos locais com elevado número de pombos ou por contato com os respectivos nichos⁹ através da inalação de grande quantidade dos propágulos.

Staib¹⁰ demonstrou que a ocorrência de *C. neoformans* e outras espécies do gênero, em excretas de pássaros não é acidental pois, as purinas, especialmente ácido úrico, xantina, guanina (componentes da urina) são em maior ou menor grau assimilados por todas as espécies.

Algumas pesquisas têm sido realizadas no Brasil para estudar o habitat de *C. neoformans*^{9,11,12,13}. Segundo Filiú et al.¹, a busca de novos habitats é um dos caminhos para elucidar o entendimento da ecologia desta levedura na natureza.

Swinne et al.¹⁴ isolaram *C. neoformans* da poeira doméstica das amostras oriundas das residências dos pacientes com criptococose associada a AIDS. Estudos demonstram uma correlação significativa entre a existência de pombos próximos ao ambiente domiciliar e a probabilidade de contaminação dessas residências por *Cryptococcus neoformans*, conseqüentemente, paciente com AIDS apresentavam risco aumentado de adquirir a doença quando residentes em domicílio positivo para o fungo.

Tabela 1. Presença simultânea de *Cryptococcus* e parasitos em 68 amostras de “pools” de fezes de pombos de acordo com o local de coleta. Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Local de coleta	<i>Cryptococcus</i> e parasitos	N	%
Feira de Artes e artesanato	<i>C. laurentii</i> + nematóides	03	4,4
	<i>C. laurentii</i> + <i>Ascaris</i> sp	02	2,9
	<i>C. laurentii</i> + ancilostomídeos	02	2,9
	<i>C. laurentii</i> + coccídeos	02	2,9
	<i>C. laurentii</i> + <i>Giardia</i> sp	02	2,9
	<i>C. laurentii</i> + <i>Entamoeba</i> sp	01	1,5
	<i>C. laurentii</i> + <i>C. albidus</i> + <i>Ascaris</i> sp + coccídeos	01	1,5
	<i>C. laurentii</i> + <i>C. uniguttulatus</i> + <i>Entamoeba</i> sp + ancilostomídeos	01	1,5
Catedral	<i>C. laurentii</i> + <i>Entamoeba</i> sp	01	1,5
Praça Coração de Maria	<i>C. laurentii</i> + ancilostomídeos	01	1,5
	<i>C. laurentii</i> + <i>Entamoeba</i> sp	01	1,5
Total		17	25,0

Em nosso trabalho observamos que o isolamento de *Cryptococcus* spp a partir de fezes de aves é extremamente difícil, pois o desenvolvimento das colônias de *Cryptococcus* é mais lento e tardio em relação as leveduras do gênero *Candida* e dos fungos filamentosos, sendo perceptível a partir do segundo dia de incubação.

Embora não tenhamos isolado *Cryptococcus neoformans*, encontramos três espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus* sendo que estas já foram descritas como agentes responsáveis por meningite, afecções pulmonares, abscessos e dermatomicoses^{15,16}. De acordo com Khawcharoenporn et al.¹⁷, *C. albidus* e *C. laurentii* juntos são responsáveis por 80% dos casos de criptococose causada por *Cryptococcus* não-*neoformans* e não - *gattii*.

Estudos demonstram uma variação no isolamento de *C. neoformans* a partir de excretas de pombos de 24,7% a 4,6%^{9,11,18,19,20}. Reolon et al.³ relatou encontrar 100% de *Cryptococcus neoformans* em amostras de fezes de pombos coletadas em Porto Alegre, para a identificação da espécie foi considerado apenas a prova da urease e presença de cápsula (tinta da China). Em nossos estudos utilizamos também, para definição da espécie, provas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio bem como a prova da feniloxidase.

Em nossa região Pedroso⁶, ao analisar 62 amostras de fezes de pombos, isolou *C. neoformans* (21%), *C. albidus* (21%), *C. laurentii* (11,3%) e *C. unigutulatus* (3,2%). Embora a metodologia usada tenha sido semelhante á de Pedroso, em nosso estudo não foram encontrados *C. neoformans*. Talvez o período de coleta das amostras possa ser a explicação para esta diferença. Pedroso⁶ coletou as amostras no período de agosto a dezembro e no presente trabalho as amostras foram coletadas de janeiro a setembro sendo a maioria delas colhidas no verão. *Cryptococcus neoformans* não cresce a temperaturas acima de 40°C bem como é sensível á luz solar direta²¹.

No Brasil são escassos os estudos sobre a presença de parasitos em excretas de pombos². Neste estudo encontramos a presença de parasitos em 32% das amostras coletadas. Schüller² em estudo realizado em diferentes locais dos municípios de São Paulo, Santo André e Santos, analisou 12 amostras de excretas de fezes de pombos observando uma positividade de 100%. Os parasitos identificados foram: *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Giardia* spp, *Entamoeba histolytica*, *Iodamoeba* spp, *Isospora* spp, *Chilomastix* spp, *Ascaris* spp, *Trichuris* spp, *Hymenolepis* spp, *Strongyloides* spp, *Enterobius* spp e *Ancylostoma* spp, com frequências variáveis de acordo com os locais de coleta.

A identificação dos parasitos encontrados neste estudo foi baseada nas características morfológicas dos mesmos, o que dificulta a diferenciação entre parasitos de animais, de humanos e de vida livre. Para a identificação adequada dos mesmos é necessário o uso de técnicas mais aprimoradas como cultura, microscopia eletrônica, inoculação em animais, biologia molecular, entre outras, as quais são mais demoradas e dispendiosas, tornando inviável a realização das mesmas dentro

da nossa realidade laboratorial. Apesar desta limitação metodológica, encontramos neste estudo vários parasitos que podem ser patogênicos para o homem como *Ascaris* spp, *Entamoeba* spp, ancilostomídeos, *Giardia* spp e coccídeos.

Os ancilostomídeos, parasitos observados com maior frequência (10,3%), foram encontrados na forma de ovos e larvas, estas últimas apenas na Praça das Bandeiras, indicando que neste local houve condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento deste parasito.

Vários fatores podem contribuir com as diferentes positivities de parasitos obtidas nos locais de coleta. As frequências mais elevadas encontradas na Praça das Bandeiras onde localizam-se a Catedral Metropolitana e a Feira de Artes e Artesanato, talvez possam ser explicadas pela existência de uma grande vegetação arbórea neste local em relação à Praça Coração e Maria e o Terminal Rodoviário. As árvores protegem o ambiente contra os raios solares que levam à dessecação dos parasitos e preserva a umidade que favorece o desenvolvimento e a sobrevivência de ovos, larvas e cistos.

Entre os protozoários observados destacam-se *Giardia* spp e os coccídeos como *Cryptosporidium* spp, protozoários do homem e de várias espécies animais domésticas e selvagens. Ambos possuem características que contribuem para dispersão e contaminação ambiental, pois os (oo) cistos dos mesmos são eliminados já infectantes nas fezes do hospedeiro e são altamente resistentes às condições adversas ambientais, podendo sobreviver por semanas a meses no meio externo. Podem ser transmitidos tanto pelo contato direto fecal/oral como pela ingestão de comida e água contaminados e também por inalação. Por possuírem resistência aos processos de cloração da água e baixa dose infectante, emergiram nas últimas décadas como os principais patógenos associados à veiculação hídrica, sendo responsáveis por numerosos surtos epidêmicos em diversos países²². Isto acarretou mudanças na legislação sobre a qualidade da água em diversos países, incluindo o Brasil²³. A taxonomia e o potencial zoonótico deste parasitos foram recentemente melhor esclarecidos através do desenvolvimento de técnicas de biologia molecular²⁴. Embora infecções pelo *Cryptosporidium* tenham sido encontradas em mais de 30 espécies diferentes de aves, há somente três espécies aviárias conhecidas: *C. bailey* e *C. meleagridis* e *C. galli*. Infecções por *C. meleagridis*, já foram registradas tanto em indivíduos imunocomprometidos como em imunocompetentes, sendo a terceira espécie mais comum descrita em humanos^{25,26}. Achados de *C. bailey* e outros genótipos não conhecidos em ambientes aquáticos indicam que pássaros e aves silvestres podem contribuir na contaminação da água²⁷. Recentemente novos genótipos foram identificados em aves, indicando que este parasito tem capacidade de infectar numerosas espécies de aves. Entretanto ainda são requeridos estudos que possam esclarecer o potencial zoonótico destes novos genótipos e as implicações para a saúde pública²⁸.

Giardia é um gênero de taxonomia ainda controversa. Atualmente são reconhecidas seis espécies, sendo que o homem

e os mamíferos são os principais hospedeiros da *G. duodenalis* e as aves da *G. psittaci* e *G. ardeae*. Algumas espécies são hospedeiro-específicas enquanto que outras como a *G. duodenalis* possuem grupos genotípicos (“Assemblages”) que infectam tanto o homem como animais domésticos e silvestres. Somente dois destes “Assemblages” (A e B) estão associados à infecção humana, mas pouco se sabe sobre o potencial zoonótico de animais hospedeiros deste genótipos²⁴.

CONCLUSÃO

A elevada positividade das amostras para *Cryptococcus* spp e/ou parasitas em relação aos diferentes locais de coleta e principalmente, nas lonas das barracas de alimentos da Feira de Artes e Artesanato chamam a atenção para o risco da ocorrência da transmissão humana. Esperamos contribuir com estes resultados para que as autoridades competentes adotem medidas para controle efetivo da população de pombos, evitando a contaminação ambiental. Ressalta-se a necessidade de ações educativas e de sensibilização da população em geral, no sentido de não alimentar os pombos, evitando a proliferação dos mesmos em áreas públicas.

REFERÊNCIAS

1. Filiu WFO, Wanke B, Agüena SM, Vilela VO, Macedo RCL, Lazera MS. Cativoiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002; 35(6): 591-5.
2. Schüller M. Pesquisa de protozoários e helmintos de interesse médico presentes nos excretas do pombo doméstico *Columba livia domestica*. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2004.103p.
3. Reolon A, Perez LRR, Mezzari A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *J Bras Patol Med Lab*. 2004; 40 (5): 293-8.
4. Littman ML, Borok AC. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heart resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol Mycol Appl*.1968; 35(3): 329-45.
5. Fundação SEADE (Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados). Informações dos municípios paulistas. Disponível em: <<http://www.seade.gov.br>> [Acessado em 25 de março de 2008].
6. Pedrosa RS. *Cryptococcus* spp de fontes ambientais em Ribeirão Preto: ocorrência, fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos. [Dissertação de Mestrado], Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP; 2004.
7. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. *Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8 ed., São Paulo: Sarvier, 1991. 695p.
8. Lenette EH, Ballows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology*, 4th ed., Washington: American Society for Microbiology, 1985.
9. Lazera MS, Wanke B, Nishikawa MM. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Méd Vet Mycol*. 1993; 31:449-54.
10. Staib F. Saprophytic life of *Cryptococcus neoformans*. *Ann Soc Bel de Méd Trop* 1964; 44:611-18.
11. Baroni FA, Paula CR, Silva EG, Viani FC, Rivera ING, Oliveira MTB, Gambale W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. *Rev Inst Med Trop. S Paulo* 2006; 48(2): 71-5.
12. Soares MCB, Paula CR, Dias ALT, Caseiro MM, Costa SOP. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop. S Paulo* 2005; 47(1): 31-36.
13. Lazera MS, Cavalcante MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol Oxford*. 2000; 38(5):379-83.
14. Swinne D. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. *Sabouraudia Edinburgh* 1975; 13:303-8.
15. Johnson LB, Bradley SF, Kauffman CA. Fungemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-*neoformans* cryptococcosis. *Mycoses*. 1998; 41:277-80.
16. McCurdy MD, Morrow JD. Ventriculitis due to *Cryptococcus unigutulatus*. *Southern Medical Journal* 2001; 94:65-66.
17. Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Muny LM. Non-*neoformans* cryptococcal infectious: a systematic review. *Infection*. 2007; 35:51-7.
18. Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brasil. *Med Mycol*. 2000; 38:385-90.
19. Ruiz A; Vélez D; Fromthing RA. Innovation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* from Puerto Rico: distribution and variety. *Mycopathology (Den Haag)*. 1989; 106: 167-70.
20. Yildiran ST; Saracli MA; Gönlün A; Gün H. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* from pigeon droppings collected throughout Turkey. *Med Mycol*. 1998; 36:391-4.
21. Ishaq CM, Bulmer GS, Felton EG. An evaluation of various environmental factors affecting the propagation of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathology (Den Haag)*.1968; 35:81-90.
22. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health*. 2007;5(1):1-38.
23. Brasil. Portaria nº518 de 2004 do Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção I, n. 59, p. 266-70*.
24. Hunter PR, Thompson RC. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol*. 2005; 35 (11-12):1181-90.
25. Gatei W, Greensill J, Ashford RW, Cuevas LE, Parry CM, Cunliffe NA et al. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *J Clin Microbiol*.2003; 41(4): 1458-62.
26. Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, et al. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis* 2001; 183 (3): 492-7.
27. Graczyk TK, Majewska AC, Schwab KJ. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. *Trends Parasitol*. 2008; 24 (2):55-9.
28. Ng J, Pavlasek I, Ryan U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72(1): 7548-7553.

***Salmonella* sp. em corações e fígados normais e condenados de frangos de corte abatidos no estado de Goiás e identificação da suscetibilidade a antimicrobianos**

Salmonella sp. in normal and condemned heart and liver from broiler slaughtered in Goiás state and identification of susceptibility to antimicrobial agents

RIALA6/1167

Cíntia Silva Minafra e REZENDE^{1*}, Maria Auxiliadora ANDRADE¹, Albenones José de MESQUITA¹, Karyne Oliveira COELHO¹, Cibele Silva MINAFRA², Marcele Louise Tadaieski ARRUDA¹, Moacir Evandro LAGE¹

* Endereço para correspondência: Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, CEP 74690-900, Goiânia, GO/ Brasil. e-mail: cintia@cpa.vet.ufg.br/cintiaminafra@gmail.com Telefone: (62) 3521-1576 – ramal 23

¹ Centro de Pesquisa em Alimentos, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO/ Brasil.

² Departamento de Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG/ Brasil.

Recebido: 30/04/2008 – Aceito para publicação: 15/08/2008

RESUMO

Salmonella sp. constitui ameaça à segurança do alimento. Este estudo verificou a ocorrência de *Salmonella* sp. em amostras de corações e fígados normais e condenados. As amostras em análise foram subdivididas em *pools* de cinco e processadas pelo método bacteriano convencional, preconizado pela legislação. Do total de *pools*, 9,24% foram *Salmonella* positivos, correspondendo a 5,41% de corações normais e 25% de fígados condenados. *Salmonella* Enteritidis foi isolada em dois *pools* de corações normais e em sete *pools* de fígados condenados. Nesta categoria de amostras, houve o isolamento de *Salmonella* Typhimurium em dois *pools*, porém negativo em amostras de corações normais e condenados e fígados normais. As cepas isoladas foram avaliadas quanto ao perfil de suscetibilidade a treze agentes antimicrobianos. Das duas cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras de corações normais, uma apresentou resistência a um princípio ativo. A outra cepa foi sensível a todos os antimicrobianos. As cepas do sorovar isolado de fígados condenados apresentaram sensibilidade para todos os antimicrobianos avaliados. *Salmonella* Typhimurium foi isolada em dois *pools*, em que uma cepa apresentou resistência concomitantemente a quatro drogas antimicrobianas. A outra cepa mostrou-se sensível a todos os antimicrobianos testados. Os miúdos de frangos, comumente comercializados, podem representar risco à saúde pública por veicular *Salmonella* sp., além da ocorrência de isolados de *Salmonella* Typhimurium multirresistentes a drogas antimicrobianas, como identificados no presente estudo.

Palavras-chave. miúdos de frangos, *Salmonella* sp., sensibilidade a antimicrobianos.

ABSTRACT

Salmonella is hazard to food safety. This study investigated the presence of *Salmonella* sp in normal and condemned heart and liver samples from broilers. These specimens were subdivided into pools of five samples, which were processed according to the recommend procedure by Brazilian legislation. A total of 9.24% of these pools were *Salmonella* positive, which corresponded to 5.41% of normal hearts and 25.00% of condemned livers. *Salmonella* Enteritidis was isolated from two normal heart pools and seven condemned livers pools. Of these positive samples, *Salmonella* Typhimurium was isolated from two pools. The isolated strains were tested for antimicrobial susceptibility profile to thirteen antimicrobial agents. Of two *Salmonella* Enteritidis strains isolated from normal hearts, one showed resistance to one of the tested antimicrobial drugs. The other strain was susceptible to all the tested antimicrobial drugs. This

bacterium sorovar isolated from condemned livers was susceptible to all of the evaluated antimicrobial drugs. *Salmonella* Typhimurium was isolated from two pools, which showed concomitant resistance to four antimicrobials agents. The other strain showed to be sensitive to all of the tested drugs. These data show that chicken giblets, which are commonly available in markets, could be a source for *Salmonella* sp transmission. It might represent a risk to public health as the isolated *Salmonella* Typhimurium showed multiresistance to the evaluated antimicrobial agents.

Key words. chicken giblets, *Salmonella* sp., susceptibility to antimicrobial agents.

INTRODUÇÃO

A carne de aves tem se convertido em um alimento amplamente consumido mundialmente, representando uma proteína de boa qualidade. Os miúdos ou vísceras comestíveis podem ser considerados alimentos acessíveis às diversas classes sociais e o consumo *per capita* cresce a cada ano no País¹. Entretanto, esses alimentos são considerados potenciais veiculadores de *Salmonella* sp., podendo se tornar uma ameaça à segurança alimentar e ao mercado avícola, visto que as exportações confrontam-se com as barreiras sanitárias e comerciais que exigem a pesquisa deste gênero bacteriano em carcaças de frangos.

Os sorovares *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium são agentes comuns nas criações comerciais de aves e potencialmente patogênicos a humanos. *Salmonella* Enteritidis é comumente isolada de materiais avícolas enquadrando-se como principal responsável pela ocorrência de infecções humanas^{2,3}. Outro dado relevante é o caráter de microrganismo emergencial que *Salmonella* Typhimurium adquiriu, principalmente em países europeus⁴. Atualmente, o monitoramento quanto à presença de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos deve ser ampliado para a identificação dos sorovares^{5,6}.

Analisando as tendências de mercado e considerando-se as vísceras comestíveis, as agroindústrias rotulam-nas como produtos de grande aceitação pelo consumidor. Assim sendo, a investigação microbiológica destes miúdos é relevante, principalmente pelos critérios de liberação ou condenação para consumo, adotados pelos serviços de inspeção, onde a visualização macroscópica quanto à forma, cor e tamanho destes órgãos é o parâmetro principal e de ampla aplicação⁷.

Outro aspecto relevante é a avaliação de microrganismos patogênicos capazes de causar surtos de toxinfecção, principalmente quando monitora-se o caráter de sensibilidade a antimicrobianos de amplo uso e a ocorrência de sensibilidade ou resistência^{8,9}. Assim sendo, surge uma questão prioritária capaz de assegurar ações epidemiológicas para saúde pública e governamentais quanto à criação das aves, produção, fiscalização de alimentos e vigilância de microrganismos patogênicos isolados em alimentos.

Por tais afirmações, este trabalho teve por objetivo a pesquisa de *Salmonella* sp. em corações e fígados normais e condenados para consumo humano, pelo serviço de inspeção federal, de abatedouros localizados no Estado de Goiás, a identificação dos sorovares isolados, bem como a determinação do perfil de suscetibilidade das cepas a antimicrobianos usualmente eleitos para o tratamento em medicina veterinária e humana.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Em três abatedouros de aves, fiscalizados pelo serviço de inspeção federal (SIF), foram efetuadas quatro visitas em cada, realizando-se a coleta de amostras na plataforma de evisceração. Um total de 595 carcaças de frango subsidiou a coleta de 185 corações e 185 fígados normais. Colheu-se também 45 corações e 180 fígados caracterizados como não aptos ao consumo humano. Justifica-se este total de órgãos em número divergente de 185, quando comparados ao total de amostras normais, pelo fato de haver um quantitativo menor disponível em cada visitação.

Tabela 1. Total de amostras de corações e fígados normais e condenados, pelo Serviço de Inspeção Federal, colhidos em abatedouros do Estado de Goiás (A, B e C) e sua subdivisão em grupos compostos.

Amostra	Total	Grupo composto (pool de cinco amostras)	Abatedouro/Quatro visitas em cada agroindústria
Coração normal	185	37	A, B, C
Coração condenado	45	9	A, B, C
Fígado normal	185	37	A, B, C
Fígado condenado	180	36	A, B, C
Total	595	119	Três abatedouros/12 visitas

As quatro categorias de alimentos subdividiram-se em grupos compostos por cinco amostras cada, perfazendo 37 amostras de corações e 37 de fígados liberados para consumo, bem como em 9 de corações e 36 de fígados condenados.

Análises bacteriológicas

Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas, sob refrigeração, ao Laboratório de Pesquisa do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (CPA/EV/UFG). O procedimento analítico adotado foi o isolamento bacteriano convencional^{10,11}. Cada amostra foi triturada em equipamento *stomacher* e após homogeneização, dois gramas foram inoculados em uma seqüência de tubos contendo 20mL de caldo BHI (infusão cérebro-coração) e selenito cistina (SC). Porções de 0,2 grama foram transferidas para tubos contendo 20 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV). Os tubos de SC e RV foram incubados a 42°C, por 24 horas e os de BHI, a 37°C, por igual período de tempo.

Finalizada a fase inicial de enriquecimento seletivo, uma alíquota foi retirada para a semeadura em triplicata de placas de Petri nos ágar MacConkey (MC), *Salmonella-Shigella* (SS) e Hektoen (HK). Procedeu-se o esgotamento em estrias e incubação a 37°C, por 24 horas. Ao término deste período, cinco a oito unidades formadoras de colônias (UFC) sugestivas de pertencerem ao gênero *Salmonella* foram inoculadas em ágar tríplice açúcar ferro (TSI ou TAF) e incubadas a 37°C, por 18 horas.

Dos tubos de ágar tríplice açúcar ferro que apresentaram reações compatíveis com *Salmonella*, procedeu-se a avaliação bioquímica. As cepas que apresentaram padrão bioquímico característico foram submetidas ao teste sorológico com soro polivalente anti-O. Após esta confirmação, onze cepas, inoculadas em ágar nutriente, foram encaminhadas ao laboratório de referência do Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobactérias da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - RJ) para tipificação sorológica, o que atualmente é uma exigência do Programa de Redução de Patógenos, Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp em Carcaças de Frangos e Perus⁶ do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Determinação da suscetibilidade a antimicrobianos

As cepas isoladas foram submetidas ao teste de sensibilidade a 13 antimicrobianos por meio da técnica de disco de difusão em ágar^{12,13}. A escolha dos princípios ativos baseou-se na frequência de eleição dos mesmos em avicultura e terapêutica humana. Os antimicrobianos selecionados para o teste foram: ampicilina (10mcg), cefalotina (30mcg), cefoxitina (30mcg), aztreonam (30mcg), estreptomina (10mcg), gentamicina (10mcg), tetraciclina, amicacina (30mcg), netilmicina (30mcg), tobramicina (10mcg), norfloxacin (10mcg), sulfazotrim (25mcg) e cloranfenicol (30mcg).

Quatro UFC's estriadas em ágar Casoy foram transferidas para 3 mL de solução salina a 0,85% objetivando a obtenção de suspensão com turbidez correspondente à diluição do tubo 1 da escala de McFarland. Cada suspensão bacteriana foi inoculada em superfície em placa contendo ágar Müeller-Hinton. Quatro discos impregnados por antibióticos foram distribuídos sobre o ágar, respeitando-se uma distância mínima de 10 a 15 mm entre eles. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Finalmente foram medidos os diâmetros dos halos ou zona de inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 constam os resultados relativos ao isolamento de *Salmonella* sp. nos miúdos de frangos. Do total de 119 amostras analisados, 11 (9,24%) mostraram-se positivos para o gênero. Os sorovares identificados foram *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Estes resultados evidenciam a presença do patógeno em plantéis destinados ao abate e em vísceras consideradas ao consumo humano.

Não houve isolamento em corações condenados e fígados liberados pela inspeção, porém, nota-se que *Salmonella* Enteritidis esteve presente em duas (5,41%) das 37 amostras de corações normais ou aptos ao consumo e em sete (19,44%) de fígados condenados. *Salmonella* Typhimurium foi isolada apenas em fígados condenados, perfazendo 5,56% de positividade para o gênero nesta categoria de amostra. Barcelos et al.¹⁴ não observaram isolamento de *Salmonella* sp. na totalidade de fígados condenados avaliados, o que não se assemelha aos achados do presente estudo.

A presença de *Salmonella* em plantas processadoras de alimentos de origem aviária é uma realidade indesejável, facilitando a disseminação do agente nas operações do fluxograma, decorrendo em contaminação do produto acabado, bem como de seus subprodutos.

Além disso, vísceras classificadas como impróprias ao consumo, pela inspeção visual e macroscópica, podem ser condenadas ou submetidas ao aproveitamento parcial com envio à graxaria para fabricação de farinhas utilizadas na alimentação animal. Sabe-se que o processamento destes ingredientes ocorre em altas temperaturas propiciando eliminação de *Salmonella* sp., no entanto, nova contaminação destes subprodutos é fator comum na indústria. Isto permite a contaminação futura dos plantéis pela ingestão de rações contaminadas, pois ingredientes de rações de produtos de origem animal não garantem ausência de *Salmonella* sp. mesmo que submetidos ao tratamento térmico^{15,16}.

As agroindústrias, por meio de seus sistemas de gestão da segurança de alimentos, análise de perigos e pontos críticos de controle, aplicação de boas práticas de fabricação e do programa de redução de patógenos, alicerçado pela legislação nacional⁶, bem como das exigências instituídas pelos países importadores de carne avícola, trabalham com o propósito de reduzir e eliminar este patógeno de seu ambiente evitando assim

a contaminação de lotes, disseminação e perpetuação da bactéria em seus processos operacionais.

Em contrapartida, a contaminação do ambiente de criação das aves, das rações, dos plantéis propriamente ditos, seja por transmissão horizontal ou vertical entre as aves, contribui para a introdução e perpetuação deste microrganismo nos abatedouros^{17,18}.

No entanto, considerando o tipo de amostra analisada, pode-se constatar que a rastreabilidade da contaminação não é conclusiva, pois a presença de *Salmonella* Enteritidis e

Salmonella Typhimurium nos miúdos pode ter origem na granja ou por contaminação cruzada nos abatedouros avícolas.

Outro dado importante a ser considerado relaciona-se aos grupos em que ocorreu a presença de *Salmonella* sp. Corações de aves são consumidos, preferencialmente, sob a forma de alimento assado. Este tipo de ação do calor nem sempre garante sua penetração eficiente e homogênea no exterior e interior da víscera; o que ressalta a probabilidade do patógeno não ser destruído decorrendo em risco para o consumidor.

Tabela 2. *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Typhimurium (ST) isoladas de corações e fígados normais e condenados, pelo Serviço de Inspeção Federal, em abatedouros do Estado de Goiás (A, B e C).

Amostra	Total*	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.	Isolamento (%)	Sorovares Isolados	Abatedouro
Coração normal	185	2/37	5,41 (SE)	2SE	B,C
Coração condenado	45	0/9	-	-	-
Fígado normal	185	0/37	-	-	-
			5,56 (ST)	2 ST	
Fígado condenado	180	9/36	19,44 (SE)	7SE	A, B e C
Total	595	11/119	9,24	-	-

* Amostras totais subdivididas em grupos de cinco unidades para cada categoria, conforme Tabela 1.

Tabela 3. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Typhimurium (ST) isoladas de vísceras contaminadas: corações normais (CN) e fígados condenados (FC) provenientes de três abatedouros avícolas do estado de Goiás, caracterização do número de cepas sensíveis, com sensibilidade intermediária e resistentes.

Antimicrobiano	Padrão de suscetibilidade dos sorovares SE e ST isolados de CN e FC										
	Número de cepas sensíveis			Número de cepas com sensibilidade intermediária						Número de cepas resistentes	
	SE	FC	FC	SE	FC	ST	FC	SE	FC	ST	FC
ampicilina	2	7	1	-	-	-	-	-	-	-	1*
cefalotina	2	7	2	-	-	-	-	-	-	-	-
cefotaxima	2	7	2	-	-	-	-	-	-	-	-
aztreonam	2	7	2	-	-	-	-	-	-	-	-
estreptomicina	2	7	2	-	-	-	-	-	-	-	-
gentamicina	2	7	2	-	-	-	-	-	-	-	-
tetraciclina	1	7	1	-	-	-	-	1#	-	-	1*
amicacina	2	7	2	-	-	-	-	-	-	-	-
tobramicina	2	7	2	-	-	-	-	-	-	-	-
sulfazotrim	2	7	1	-	-	-	-	-	-	-	1*
norfloxacina	2	7	2	-	-	-	-	-	-	-	-
netilmicina	2	7	2	-	-	-	-	-	-	-	-
cloranfenicol	2	7	1	-	-	-	-	-	-	-	1*

Análises realizadas em duas cepas de SE isoladas de corações normais, 2 cepas de ST isoladas de fígados condenados e 7 cepas de ST isoladas de fígados condenados

cepa de *Salmonella* Enteritidis proveniente de coração normal que apresentou resistência a tetraciclina

* cepa de *Salmonella* Typhimurium proveniente de fígado condenado que apresentou resistência simultânea a mais de um princípio antimicrobiano.

Nascimento et al.¹⁹, Peresi et al.², Corrier et al.²⁰ e Rezende et al.²¹ foram unânimes em declarar que a detecção de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium demonstrou maior frequência em plantéis avícolas.

Quanto aos resultados observados dos antibiogramas, convém salientar, que as cepas avaliadas foram isoladas de órgãos normais e condenados pelo SIF. Pode-se verificar, na Tabela 3, que uma cepa de *Salmonella* Enteritidis, isolada de coração normal, demonstrou resistência à tetraciclina, antibiótico com ampla utilização em medicina veterinária e de escolha secundária em medicina humana. Não foi observada sensibilidade intermediária e identificou-se que as demais cepas foram sensíveis a todos os antimicrobianos eleitos. Este achado apresenta semelhança às descrições feitas de que *Salmonella* Enteritidis de origem não humana apresenta resistência a tetraciclina, pela ampla aplicação do princípio ativo nos processos infecciosos de animais domésticos destinados à alimentação^{22,23}.

Quanto ao sorovar *Salmonella* Typhimurium, isolado apenas em fígados condenados, observa-se que uma cepa apresentou resistência a quatro antimicrobianos, caracterizando multiresistência^{24,25}, realidade de grande preocupação para o estudo epidemiológico, em todo o mundo, deste sorotipo atualmente considerado como emergente, seja proveniente de isolamento de alimentos ou infecções humanas. A outra cepa de *Salmonella* Typhimurium foi sensível a todos os antimicrobianos testados.

É importante salientar que todas as cepas de *Salmonella* Enteritidis foram sensíveis ao cloranfenicol de uso proibido em criações animais. No entanto, uma cepa (50%) de *Salmonella* Typhimurium foi sensível a este antimicrobiano.

Quanto ao perfil de sensibilidade é importante comentar que todas as cepas dos dois sorovares identificados foram sensíveis às cefalosporinas, antibióticos de eleição para o tratamento de salmoneloses invasivas diagnosticadas em crianças, de acordo com as ponderações feitas por Yan et al.²⁶.

CONCLUSÕES

Os sorovares reportados na literatura como mais frequentes em amostras aviárias e surtos de toxinfecção alimentar foram os mesmos isolados das amostras analisadas. Vísceras comestíveis macroscopicamente normais à inspeção podem ser veiculadoras de *Salmonella* sp. representando risco potencial à saúde pública, bem como para os processos de fabricação de alimentos de origem animal. *Salmonella* Enteritidis foi o sorovar mais frequente, no entanto, 88,9% das cepas mostraram-se sensíveis a todos os antimicrobianos. *Salmonella* Typhimurium apresentou multiresistência em 50% dos isolados.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, ao Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão de bolsa de estudo (Processo Nº 132172/2000-3), à Fundação Instituto Oswaldo Cruz pela tipificação dos isolados de *Salmonella* sp. e aos abatedouros que permitiram a realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos [ABEF]. Relatório Anual 2006. São Paulo; 2006. p.38. Disponível: <http://www.abef.com.br>. Acesso em 01 de abril de 2008.
2. Peresi JTM, Almeida IAZC, Lima SI, Marques DF, Rodrigues ECA, Fernandes AS, Gelli DS, Irino K. Surto de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. Rev Saúde Publ. 1998; 32(5): 477-83.
3. Munro DS, Girwood RWA, Reilly WJ. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Scotland. In: Saeed AM. editors. *Salmonella enterica serovar Enteritidis* in humans and animals – epidemiology, pathogenesis and control. 1.ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 27-31.
4. Fisher IS. *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in Western Europe for 1993-1995: a surveillance report from Salm-Net. Euro Surveill. 1997; 2 (1):p. 91. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=191>. Acesso em 10 de março de 2008.
5. Alexandre MS, Pozo CM, González VG, Martínez MCH, Prat SM, Fernández AR, Fica AC, Fernández JO, Heitmann IG. Detección de *Salmonella* Enteritidis em muestras de productos avícolas de consumo humano em la Región Metropolitana de Chile. Resumen. Rev Méd. Chile 2000; 128(10):1075-83.
6. Brasil. Instrução Normativa Nº 70, de 10 outubro de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 out. 2003. Seção 1, p. 9.
7. Brasil. Portaria Nº 210, de 10 novembro de 1998 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 nov. 1998. Seção 1, p. 226.
8. Cardoso MO. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos e eficiência de desinfetantes em amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de carcaças de frangos no estado do Rio Grande do Sul. [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. 108p.
9. White DG, Zhao S, Simjee S, Wagner DD, Mcdermott PF. Antimicrobial resistance of food-borne pathogens. Microb Infect. 2002; 4: 405-12.
10. Brasil. Portaria nº 126, de 03 de novembro de 1995. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Aprova as Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium*). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 6 nov. 1995. Seção I, p.17694-8.
11. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Animal. Coordenação de Laboratório Animal. Método de Análise Microbiológica para Alimentos, 1999, 226 p.
12. Bauer AW, Kirby WMM, Scherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American J Clin Pathol. 1966; 45: 493-6.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals, Approved Standard, 2nd ed. M31-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne (PA), USA, 2002.

14. Barcelos AS, Flores ML, Kommers GD, Nascimento VP, Segabinazi SD, Antoniazzi T, Bassan JDL. Macroscopia, histopatologia e bacteriologia de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate. *Ciênc Rural*. 2006; 36 (2): 561-7.
15. Baú AC, Carvalhal JB, Aleixo JAG. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil *Ciênc Rural* 2001; 31 (2): 303-7.
16. Oliveira G. Avaliação de pontos críticos de contaminação por *Salmonella* sp. no processo da fabricação da farinha de vísceras, destinada à fabricação de rações para aves [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996. 64p.
17. Waltman WD. Methods for isolating Salmonellae from poultry and the poultry environment. In: Saeed AM. editors. *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* in humans and animals – epidemiology, pathogenesis and control. 1.ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 419-32.
18. Chang, Y.H. Prevalence of *Salmonella* spp. in poultry broilers and shell eggs in Korea. *J Food Prot.* 2000; 63(5): 655-8.
19. Nascimento VP, Oliveira SD, Ribeiro AR, Santos LR, Cardoso MO, Pontes AP, Silva AB, Rocha LS. Identificação de sorovares de *Salmonella* em cortes e carcaças de frangos. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1997, Rio de Janeiro, RJ. **Anais**, São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. p.287.
20. Corrier DE, Byrd JA, Hargis BM, Hume ME, Bailey RH, Stanker AM. Presence of *Salmonella* in crop and ceca of broiler chickens before and after preslaughter feed withdrawal. *Poultry Science* 1999; 78: 45-9.
21. Rezende CSM, Mesquita AJ, Andrade MA, Linhares GFC, Mesquita AQ, Minafra CS. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. *Rev Port Cienc Vet.* 2005; 100(555-556): 199-203.
22. Angulo FJ, Baker NL, Olsen SJ, Anderson A, Barret TJ. Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Sem Pediatr Infect Dis.* 2004;15 (2):78-85.
23. Oliveira SD, Flores FS, Santos LR, Brandelli A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *Int J Food Microbiol.* 2005; 97(3): 297-305.
24. Tschape H, Liesegang A, Gericke B, Prager R, Rabsch W, Helmut R. Ups and downs of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Germany. In: Saeed AM. editors. *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* in humans and animals – epidemiology, pathogenesis and control. 1.ed. Ames: Iowa State University Press, 1999, p. 51-61.
25. Delicato EL, Mickcha JMG, Fernandes SA, Pelayo JS. Resistance profile to antimicrobials of *Salmonella* spp. isolated from humans infections. *Braz Arch Biol Technol.* 2004;47(2): 193-7.
26. Yan SS, Pendrak ML, Abela-Ridder B, Punderson VMD, Fedorko DP, Foley SL. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. *Clin Appl Immunol Rev.* 2003; 4: 189-204.

Citologia em meio líquido para exame de citologia cérvico-vaginal. Estudo comparativo sobre a atividade fixadora de etanol e de formaldeído

The use of formaldehyde and ethanol as fixative agents in the liquid-based cytology technique for performing cervical cytology exams (Pap test)

RIALA6/1168

Jacqueline Plewka MACHADO*, Aguinaldo José NASCIMENTO, Maria Suely Soares LEONART.

* Endereço para correspondência: Rua Curitiba, 440 apto. 22, CEP: 85802-000, Centro, Cascavel, PR/Brasil. Fone: (45) 3321-5286, e-mail: jacquelineplewka@yahoo.com.br Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná. Av. Prof. Lothário Meissner, 632 Jardim Botânico, Curitiba, PR/Brasil, CEP 80210-170
Recebido:06/11/2007 – Aceito para publicação: 21/06/2008

RESUMO

A citologia em meio líquido tem sido considerada importante alternativa para o ganho de sensibilidade do exame de Papanicolaou. Este trabalho teve o objetivo de estudar variações no método de citologia em meio líquido. Foram coletadas 150 amostras cérvico-vaginais, em duplicata, de pacientes atendidas no Ambulatório do Hospital Universitário do Oeste do Paraná e em Unidades de Saúde do Município de Cascavel-PR, após a assinatura do consentimento informado. Foram preparadas 150 amostras em meio líquido, sendo 100 em etanol 95% e 50 amostras em formaldeído 1% em tampão fosfato pH 7,4. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 289 x g. Com os sedimentos obtidos, foram preparados esfregaços circulares em lâminas, os quais foram fixados em etanol 95% e corados segundo a técnica de Papanicolaou. As amostras em meio líquido de etanol e formaldeído, demonstrou celularidade satisfatória, adequabilidade em morfometria e na identificação morfológica de células, bem como sensibilidade e especificidade satisfatórias na identificação de microrganismos e de alterações celulares. As propriedades fixadoras e preservadoras do etanol e do formaldeído observadas no presente estudo os apontam como alternativas viáveis para uso em citologia em meio líquido, porém a realização de estudos complementares é necessária para efetuar aperfeiçoamento do método.

Palavras chave. citologia em meio líquido, Papanicolaou, citologia cérvico-vaginal.

ABSTRACT

The liquid-based cytology technique has been considered an important alternative for achieving the sensitivity of cervix-vaginal cytology exams. This study aimed to assess the variations in the liquid-based cytology technique. A total of 150 cervical samples were collected in duplicate from patients attended at the Clinic of the Hospital Acadêmico do Oeste do Paraná and Health Units of the Municipal District of Cascavel-PR, after the written informed consent form had been signed by them. The 100 collected samples were fixed and preserved in liquid media containing 95% ethanol and 50 samples in 1% formaldehyde in phosphate buffer pH 7.4. The samples were centrifuged at 289 x g and circular smears of the sediment were prepared on microscope slides, which were fixed in 95% ethanol followed by Papanicolaou staining, and mounted in Entellan®. The liquid-based cytology technique showed satisfactory cellularity, adequacy in morphometry and in cells morphology identification. Satisfactory sensitivity and specificity for detecting microorganisms and cellular alterations were also observed. Owing to the fixation and preservation properties of ethanol and formaldehyde, the present study points up that both preparations might be used as alternative fixative agents in liquid-based cytology technique, although further studies for method improvements have to be done.

Key word. pap test, liquid-based cytology, cervical cytology.

INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm apontado para índices não ideais de sensibilidade do preparado convencional de Papanicolaou¹. As causas citadas são: insuficiente representatividade das células escamosas, endocervicais e da junção escamo-colunar (JEC), secagem e ou má fixação do material, distribuição não homogênea das células no esfregaço, presença de leucócitos, hemácias e restos celulares em excesso².

Recentemente, desenvolveu-se um sistema de preparo de amostras de citologia em meio líquido, que tem sido considerado, nos últimos anos, importante alternativa para melhorar a sensibilidade do exame citológico cérvico-vaginal. Em especial pela melhoria na qualidade da fixação do material e na homogeneidade da distribuição celular no esfregaço, a citologia em meio líquido vem sendo apresentada não como substituta, mas sim, como um aprimoramento do teste de Papanicolaou. Possivelmente devido a estes fatores, tem-se obtido menores índices de resultados falso-negativos com esta metodologia em relação à convencional¹⁻³.

Os sistemas disponíveis para citologia cérvico-vaginal em meio líquido apresentam um custo muito mais elevado por exame em relação ao método convencional, chegando a inviabilizar o seu uso como metodologia de escolha em unidades de saúde e em programas de prevenção do câncer do colo do útero, especialmente em países em desenvolvimento⁴.

O presente trabalho visou o estudo da utilização do etanol ou formaldeído como fixadores, para o preparo de amostras cérvico-vaginais em meio líquido em comparação à citologia convencional.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de material

Coletou-se material cérvico-vaginal de 150 mulheres atendidas no Sistema Único de Saúde, para a realização do exame de Papanicolaou, após assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná. Para o exame de citologia convencional, coletou-se material da exocérvice e da junção escamo-colunar (JEC) com o auxílio de espátula de Ayre, girando-se 360°; e da endocérvice, com escova cilíndrica, girando-se 360°. Os materiais obtidos foram cuidadosamente espalhados sobre duas lâminas de microscopia, de modo regular e em um único sentido, sendo a primeira encaminhada para o exame preventivo de rotina da paciente e; a segunda, fixada em álcool etílico 95% durante no mínimo 30 min (Controle). Em seguida, coletou-se material para citologia em meio líquido com o auxílio de escova cônica (Kolplast®), processado como segue. Em 50 pacientes atendidas no Ambulatório do Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP), colocou-se a escova com o material em tubo cônico contendo 2ml de etanol 95% (Etanol). Em outras 100

pacientes atendidas nas Unidades de Saúde Palmeiras, Parque São Paulo e XIV de Novembro, do Município de Cascavel-PR, colocou-se a escova com o material em tubo cônico contendo 2ml de formaldeído a 1% em tampão fosfato 150 mmoles/l, pH 7,4 (Formaldeído). Nas amostras de citologia em meio líquido, homogeneizou-se a suspensão de células em agitador tipo vortex por 15s, retirou-se a escova cônica e centrifugou-se a 289 x g durante 5 min, desprezando-se o sobrenadante por inversão. Ressuspendeu-se o sedimento das amostras formaldeído em 2ml de álcool etílico 95% durante 60 min e, após sedimentação espontânea, retirou-se o sobrenadante com micropipeta. Confeccionou-se esfregaços Etanol e Formaldeído, pelo espalhamento de 50 µl dos sedimentos em forma circular (30mm de diâmetro), com o auxílio de ponteira de micropipeta descartável, secando-os ao ar. Fixou-se as lâminas em etanol 95% durante 30 min e procedeu-se à coloração de Papanicolaou empregando-se corantes Newprov® e montagem com Entellan®.

Avaliação citomorfológica

A leitura das lâminas foi procedida por varredura horizontal sistemática ao microscópio óptico (100x). Para observação minuciosa, utilizaram-se aumentos de 400x e 1000x. As lâminas de cada paciente foram observadas em dias alternados, para evitar indução na avaliação. A indicação dos tipos e alterações celulares, da presença de microorganismos e a classificação segundo Bethesda 2001⁶, foram feitas na forma de laudo descritivo, por consenso morfológico entre duas citologistas do laboratório de Citologia Clínica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

Celularidade

Observaram-se critérios mínimos de celularidade para citologia cérvico-vaginal em meio líquido pelo número médio de células em 10 campos representativos com objetiva de 40x, aumento 400x e diâmetro da ocular 20mm⁶.

Homogeneidade na distribuição das células

Convencionou-se que apresentavam homogeneidade satisfatória esfregaços com 10 a 30 células na maioria dos campos em aumento de 100x.

Presença de células epiteliais escamosas e glandulares

Avaliou-se a presença de células escamosas, metaplásicas e endocervicais, bem como de leucócitos polimorfonucleares, histiócitos, linfócitos e hemácias, em relação à quantidade, como: escassa (+), moderada (++), acentuada (+++) e abundante (++++), de acordo com os seus aspectos citomorfológicos⁶⁻¹¹.

Presença de alterações celulares e artefatos

Avaliou-se a presença de alterações reativas e degenerativas, como: pseudoesinofilia, metacromasia, vacuolização citoplasmática, halo perinuclear, grânulos queratohialinos, apagamento de bordos citoplasmáticos,

hiperqueratose, paraqueratose, homogeneização da cromatina, espessamento de bordos nucleares, cariorréxis, edema nuclear, binucleação, multinucleação, cariopicnose, cariólise e citólise. Observou-se também a ocorrência de alterações características de anormalidades epiteliais, como: coilocitose, hiper Cromasia, cariomegalia, aumento da relação núcleo/citoplasma, distribuição irregular da cromatina, contorno irregular do núcleo e pleomorfismo celular. Registrou-se a presença de artefatos como pleomorfismo celular, destruição celular, alterações tintoriais, fundo sujo, entre outros, sendo que alguns deles foram considerados como produtos da interferência da metodologia aplicada.

Avaliação da microbiota

Registrou-se a presença de microorganismos morfológicamente compatíveis com bacilos de Döderlein, flora mista, flora cocóide, flora bacilar, *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Actinomyces spp*, *Candida spp*, *Mobilincus spp*, e *Leptotrix spp*, entre outros, segundo critérios descritos por Silva Filho e Longatto Filho¹².

Morfometria: Analisou-se área e perímetro do citoplasma e do núcleo, bem como relação núcleo/citoplasma de células escamosas intermediárias pelo programa, UTHSCSA® *Image Tool*, em microscópio Nikon ECLIPSE® E 200, capturando-se imagens com câmera digital SANSUNG® FCC131.

Análise estatística

Empregou-se o teste Z para duas proporções, com categorias mutuamente excludentes, para análise de concordância e discordância, em relação às diferenciações celulares. Determinou-se a sensibilidade e a especificidade relativas à presença de microorganismos e de alterações celulares, em relação ao controle. Para os dados morfométricos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA, um critério) e o teste de Tukey para comparações de médias. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em levantamentos populacionais realizados pelo exame de Papanicolaou convencional, demonstrou-se que a coleta de material pode ser responsável por até 90% entre os 15 a 50% de resultados falsos negativos relatados na literatura¹³. A citologia em meio líquido pode ser mais sensível em relação à convencional na detecção de anormalidades, uma vez que as células coletadas são transferidas para um meio preservador, vindo a compor uma preparação mais homogênea e representativa^{14,15}.

Com o intuito de desenvolver uma metodologia alternativa viável e de baixo custo para citologia em meio líquido, testou-se vários meios para preservação e fixação de células epiteliais em lâmina, entre eles o etanol, amplamente empregado como fixador celular; e o formaldeído, rotineiramente empregado

como fixador de células e tecidos. Ao se testar o formaldeído 1 a 5% em tampão fosfato 150 mmoles/l pH 7,4, obteve-se satisfatoriedade apenas com 1%, com presença de artefatos e alterações morfotintoriais em concentrações maiores.

Solomon e Nayar⁷ de acordo com o Sistema Bethesda 2001, recomendam a presença de ao menos 5000 células em preparações de citologia cérvico-vaginal em meio líquido. Neste trabalho, obteve-se ao menos 10.000 células em 50% das preparações, com celularidade média na faixa de 15.000 células, demonstrando uma boa fixação do material citológico em lâmina.

Em relação às células analisadas, houve concordância nas amostras Etanol e Formaldeído em relação ao Controle (Figura 1), com exceção das células endocervicais e histiócitos, apenas para as amostras Formaldeído, $p < 0,05$. Com o emprego de formaldeído, em relação às células endocervicais, a estrutura da cromatina foi alterada, tornando-se compactada e hiper Cromática; enquanto nos histiócitos, observou-se alterações nas estruturas citoplasmáticas, não se conseguindo perceber a vacuolização, característica morfológica relevante para a identificação destas células.

A sensibilidade e a especificidade obtidas na avaliação da microbiota em preparações Etanol e Formaldeído, em comparação com as de citologia convencional, foram satisfatórias. Todos os microorganismos observados na citologia convencional também o foram na citologia em meio líquido, de um modo geral com melhor qualidade morfotintorial (Figura 2). Observaram-se apenas dois casos com resultados falso-negativos, para *Actinomyces spp* e *Candida spp*, nas preparações em meio líquido Formaldeído.

Os resultados obtidos para a presença de microorganismos na citologia em meio líquido corroboram os achados de outros autores, que apontam para sensibilidade e especificidade ótimas para o método. Roberts et al.¹⁶ referem-se ao fato de que os microorganismos são facilmente identificados em citologia em meio líquido, em comparação à citologia convencional.

A análise de alterações celulares nas preparações estudadas, em comparação com a citologia convencional, mostrou índices satisfatórios de sensibilidade e especificidade. Observou-se sensibilidade superior a 70%, em amostras Etanol, para pseudo eosinofilia, metacromasia, hiperqueratose, edema nuclear, halo perinuclear, grânulos querato-hialinos, citólise, cariopicnose, paraqueratose, cariólise, coilocitose e binucleação, e; em amostras Formaldeído, para pseudo eosinofilia, metacromasia, halo perinuclear, grânulos querato-hialinos, hiperqueratose, edema nuclear, cariopicnose, citólise e coilocitose (Figura 3). Em relação à especificidade, obteve-se valores maiores que 86% para todas as alterações observadas.

Em apenas três amostras, observou-se critérios morfológicos suficientes para classificação como lesão intraepitelial cervical de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial cervical de alto grau (HSIL) e carcinoma escamoso invasor, não permitindo o emprego de análise estatística em relação a critérios

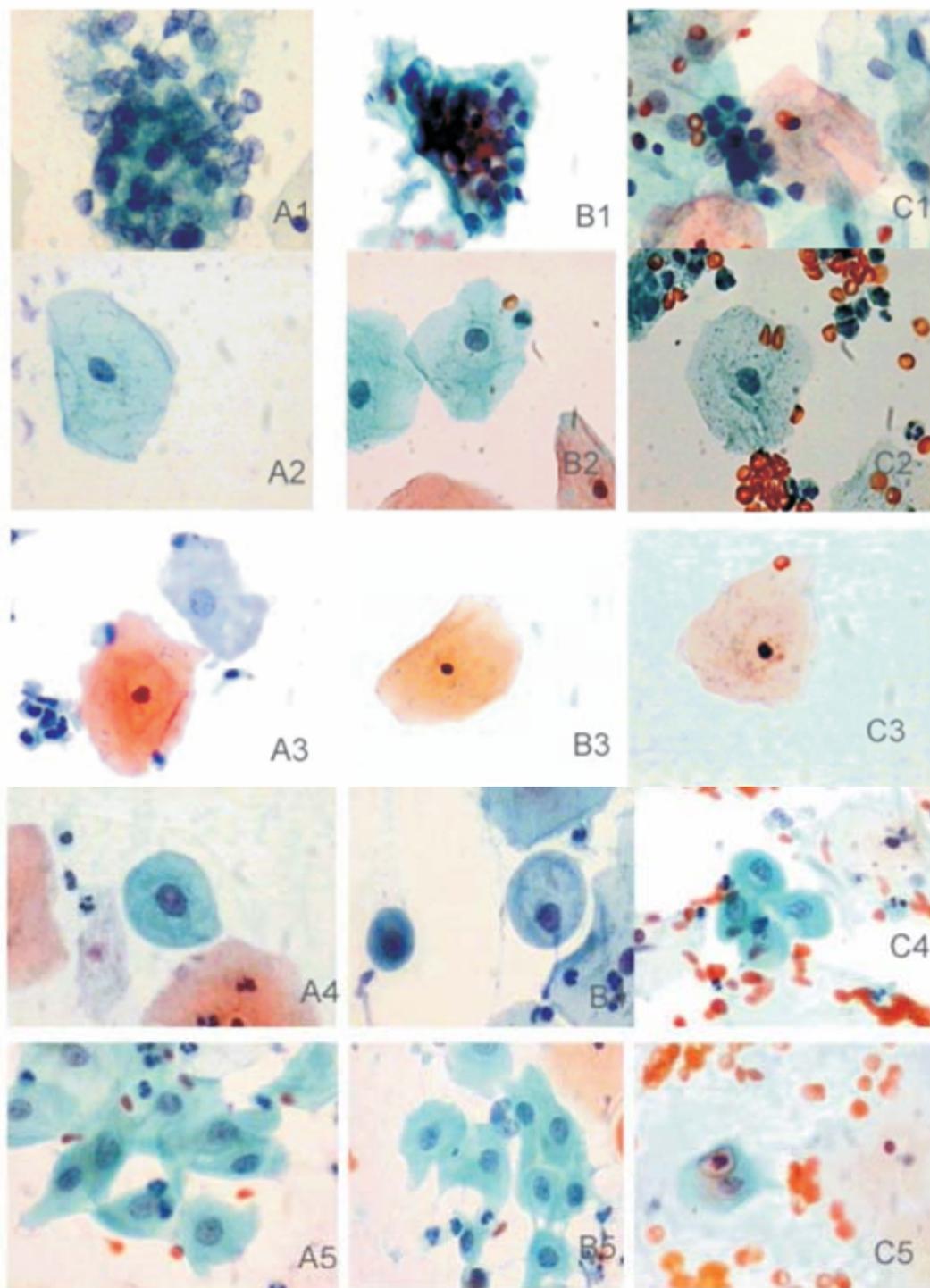


Figura 1. Fotomicrografias de células epiteliais cervicais em preparações convencionais e em meio líquido

Métodos: A - citologia convencional; B - citologia em meio líquido com etanol 95%; C - citologia em meio líquido com formaldeído 1%.
Células epiteliais cervicais: 1 - células endocervicais; 2 - células escamosas intermediárias; 3 - células escamosas superficiais; 4 - células escamosas parabasais; 5 - células metaplásicas.
Coloração de Papanicolaou (400x).

morfológicos de anormalidades epiteliais. No entanto, observou-se evidência de critérios relevantes como hiper cromasia, cariomegalia, aumento da relação núcleo-citoplasma, irregularidades na distribuição da cromatina, irregularidade do contorno nuclear, pleomorfismo celular e disqueratose nas amostras de citologia em meio líquido em relação ao controle (Figura 4).

A maioria dos estudos atribui maior sensibilidade para a metodologia em meio líquido, com resultados variáveis, tanto na detecção de LSIL, quanto de HSIL¹⁷⁻²² com aumento de 25% na sensibilidade para detecção de carcinoma cervical. No estudo de Davey et al.²³, os autores encontraram 55% mais casos ao agruparem HSIL e carcinoma, com o emprego da citologia em meio líquido.

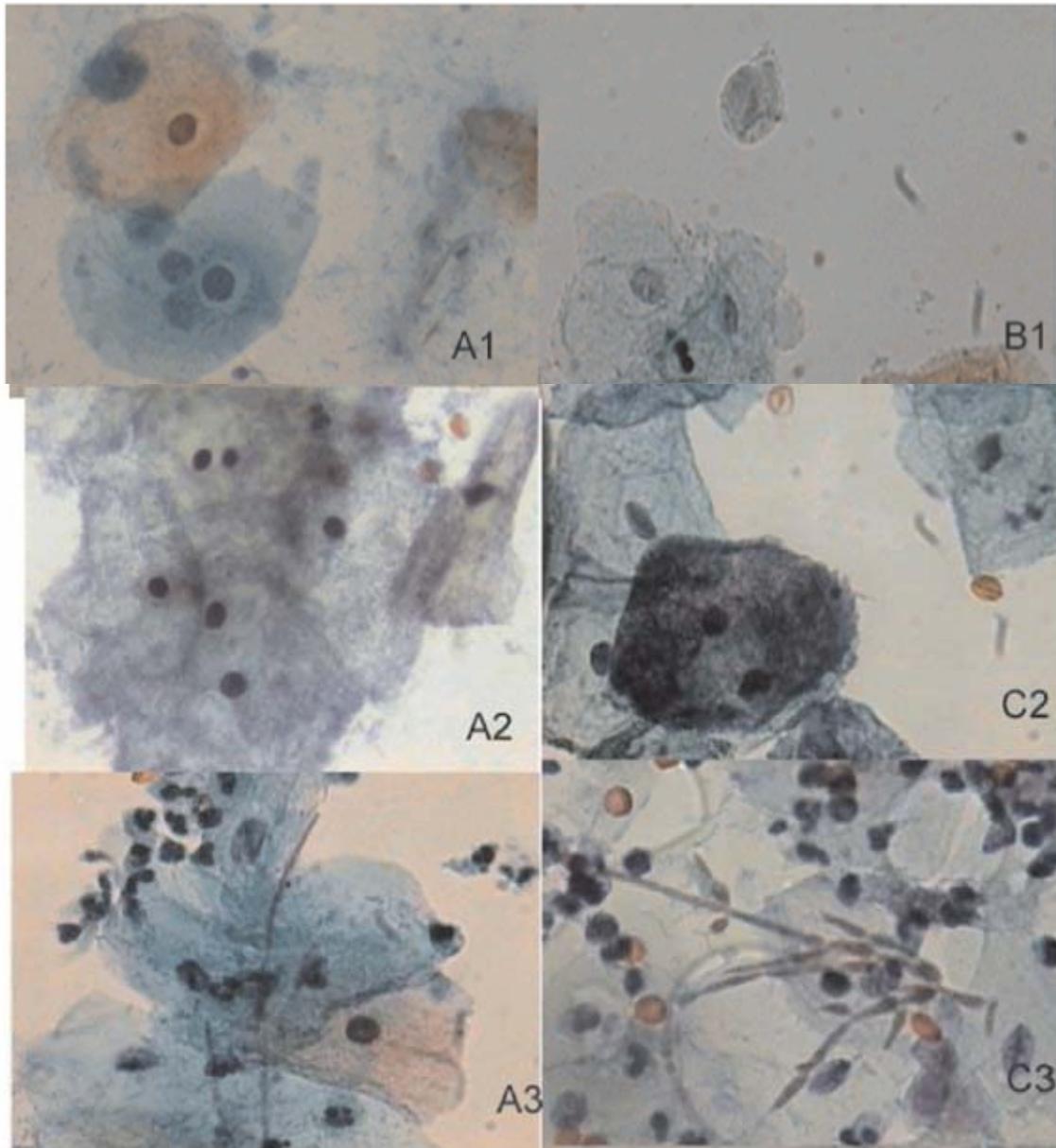


Figura 2. Fotomicrografias representativas da microbiota em preparações de citologia cervical convencional e em meio líquido

Métodos: A - citologia convencional ; B - citologia em meio líquido com etanol 95%; C - citologia em meio líquido com formaldeído 1% . Microbiota: 1 - *Trichomonas vaginalis*; 2 - *Gardnerella vaginalis* ; 3 - *Candida spp.*
Coloração de Papanicolaou (400x).

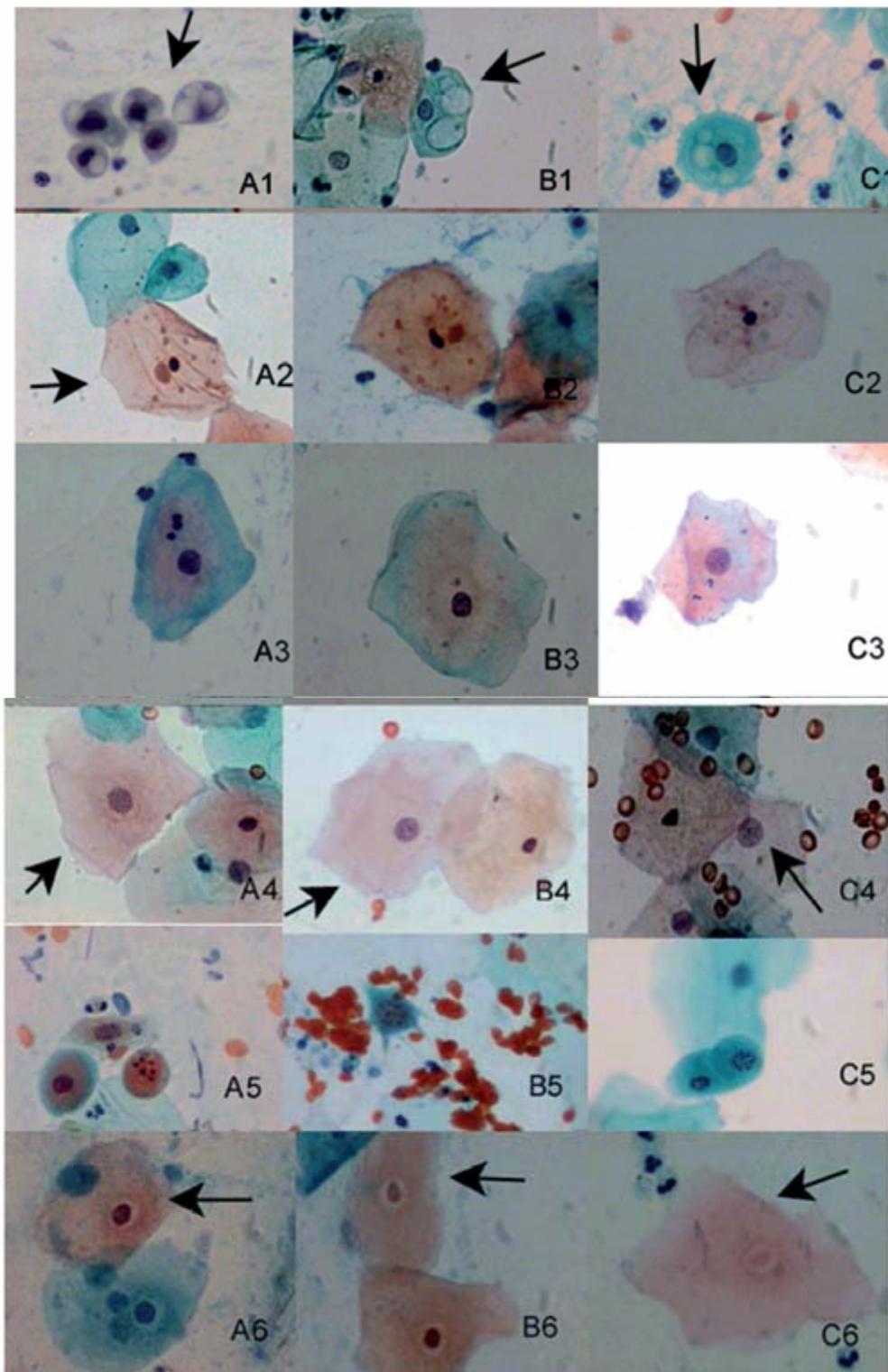


Figura 3. Fotomicrografias representativas de alterações celulares de material cérvico-vaginal em preparações convencionais e em meio líquido

Métodos: A - citologia convencional ; B - citologia em meio líquido com etanol 95%; C - citologia em meio líquido com formaldeído 1% .

Alterações celulares: 1 - vacuolização citoplasmática; 2 - grânulos querato-hialinos; 3 - metacromasia; 4 - pseudo-eosinofilia; 5 - cariorrexis; 6 - halo perinuclear. Cloração de Papanicolaou (400x).

As células escamosas intermediárias em amostras Etanol, monitoradas pelo programa *Image Tool® for Windows*, não mostraram diferenças de área e perímetro em unidades pixel (bit), em relação às preparações de citologia convencional $p>0,05$. Porém, em amostras Formaldeído, a área e o perímetro citoplasmáticos das células escamosas intermediárias foram menores em relação aos obtidos com o

método convencional $p<0,05$. Esses resultados sugerem uma possível influência do meio aquoso, que poderia ter provocado contração do citoplasma, nas amostras Formaldeído.

Não se encontrou diferença significativa na relação núcleo-citoplasma ao se comparar a citologia em meio líquido e a convencional. No entanto, houve diferença significativa entre

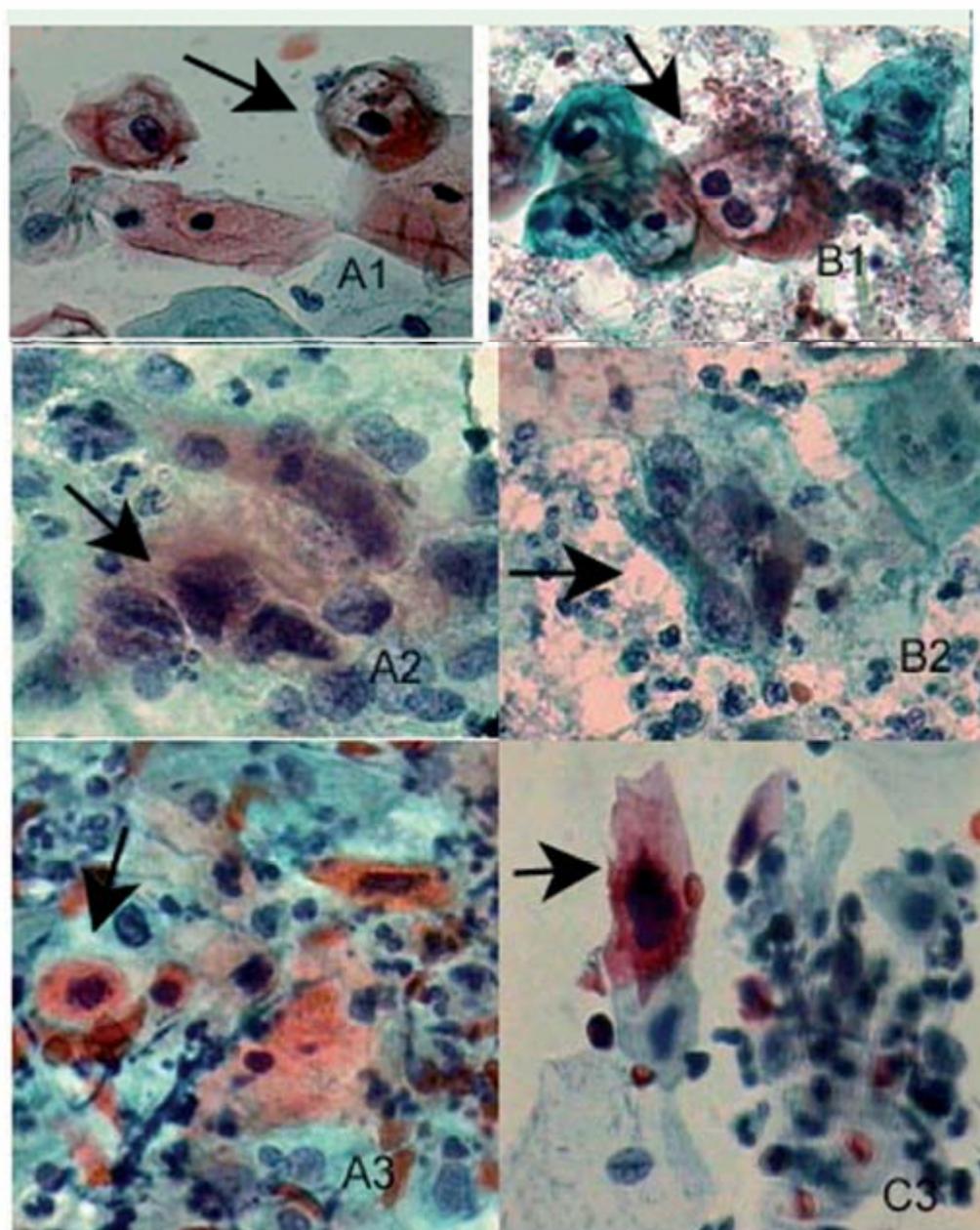


Figura 4. Fotomicrografias de citologia cérvico-vaginal de casos classificados como anormalidades epiteliais segundo o Sistema Bethesda 2001

Métodos: A - citologia convencional; B - citologia em meio líquido com etanol 95%; C - citologia em meio líquido com formaldeído 1% .

Anormalidades epiteliais: 1 - lesão intraepitelial de baixo grau (sugestiva de infecção por HPV); 2 - lesão intraepitelial de alto grau; 3 - carcinoma cervical escamoso. Coloração de Papanicolaou (400x).

os grupos estudados, com uma tendência de se observar menor relação núcleo-citoplasma no grupo no qual se comparou amostras formaldeído com a citologia convencional em relação ao grupo no qual se comparou amostras etanol ao controle, evento não explicado.

Apesar dos resultados satisfatórios obtidos para celularidade, homogeneidade e identificação de células epiteliais e de suas alterações, bem como de microorganismos, as variações no método de citologia em meio líquido propostas neste trabalho apresentaram algumas limitações. Nas amostras Etanol houve precipitação de material protéico que causou algum obscurecimento, especialmente em materiais ricos em muco, polimorfonucleares ou hemácias. Nas amostras Formaldeído houve alterações em células endocervicais e histiócitos, que dificultaram a sua identificação. Apesar do número de resultados prejudicados durante a experimentação ter sido desprezível não significa que não devam ser levados em consideração. Desta forma, conclui-se que há necessidade de estudos complementares, que possibilitem a proposição de novas variações para o método de citologia em meio líquido.

O custo do material disponível atualmente no mercado para citologia em meio líquido poderia ser reduzido em até 90%, com a aplicação das metodologias propostas. O desenvolvimento de uma metodologia alternativa para citologia cérvico-vaginal em meio líquido, que seja simples e acessível economicamente para que possa ser empregada em rastreamentos populacionais, é relevante para o desenvolvimento de países como o Brasil e para a prevenção e controle do câncer cervical.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Irene Ermelino dos Santos por seu auxílio técnico, às Equipes do Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP), das Unidades de Saúde do Município de Cascavel-PR e do Laboratório de Análises Patológicas e Clínicas do Hospital Geral do Exército de Curitiba (LAPC/HGeC), e Laboratório Prevenção e Diagnóstico por terem disponibilizado suas estruturas, e às pacientes que concordaram em participar deste estudos.

REFERÊNCIAS

1. Ronco G, Cuzick J, Pierotti P, Cariaggi MP, Dalla Palma P, Naldoni C, Ghiringhelo B, Giorgi-Rossi P, Minucci D, Parisio F, Pojer A, Schiboni ML, Sintoni C, Zorzi M, Segnan N, Confortini M. Accuracy of liquid based versus conventional cytology: overall results of new technologies for cervical cancer screening: randomised controlled trial. *BMJ*. 2007; 7: 335: 28.
2. Klinkhamer JJMP, Meerding JW, Rosier MWFP, Hanselaar MJA. Liquid-based cervical cytology. A review of the literature with methods of evidence-based medicine. *Cancer*. 2003; 99(5): 263-71.
3. Renshaw AA, Mody RD, Molly W, Bentz SJ, Colgan JT. The significance of certification in liquid-based cytology and performance in the College of American Pathologists interlaboratory comparison program in cervicovaginal cytopathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2006; 130: 1269-1272.
4. Montz FJ, Frederic LB, Ristow ER, Cornelison T. Impact of increasing Papanicolaou test sensitivity and compliance: a modeled cost and outcomes analysis. *Obstet Gynecol*. 2001; 97: 781-788.
5. Marchand L, Mundt M, Klein G, Agarwal SC. Optimal collection technique and devices for a quality pap smear. *WMG*. 2005; 104(6): 51-55.
6. Bethesda 2001. Disponível em <http://www.bethesda2001.cancer.gov.br>. acesso 16 de fevereiro 2007.
7. Solomon D, Nayar R. Sistema Bethesda para citopatologia cérvico vaginal. 2ª ed Rio de Janeiro: Revinter, 2005.
8. Cibas ES, Ducatman BS. Cytology: Diagnostic principles and clinical correlates. 2nd. London W.B. Saunders Company, 2003.
9. Bibbo M. Comprehensive Cytopathology, 2nd. Philadelphia WB Saunders Company, 1997.
10. Atkinson BF, Silverman JF. Atlas de dificuldades diagnosticas em citopatologia. Harcourt, 2000.
11. Koss LG, Melamed MR. Koss' Diagnostic cytology and its histopathology bases. 5ª ed. Philadelphia: JB. Lippincott Company, 2006.
12. Silva Filho AM, Longatto-Filho A. Colo uterino e vagina: processos inflamatórios, aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos. 1ªed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
13. Sawaya GF, Sox HC. Trials that matter: liquid-based cervical cytology: disadvantages seem to outweigh advantages. *Ann Intern Med*. 2007; 147(9): 668-669.
14. Alves VAF, Bibbo M, Schmitt FC, Milanezi F, Longatto-Filho A. Comparison of manual and automated methods of liquid-based cytology. A morphologic study. *Acta Cytol*. 2004; 48(2): 187-193.
15. Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer P, Martin-Hirsch P, Siebers AG, Bulten J. Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2008; 111(1): 167-177.
16. Roberts JM, Thurloe JK. Comparative sensitivities of ThinPrep and Papanicolaou smear for adenocarcinoma in situ (AIS) and combined AIS/high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL): comparison with HSIL. *Cancer*. 2007; 111(6): 300-305.
17. Rinas AC, Mittman BW, Le LV, Hartmann K, Cayless J, Singh HK. Split-sample analysis of discarded cells from liquid-based Pap smear sampling devices. *Acta Cytol*. 2006; 50(1): 55-62.
18. Bishop JW, Bigner HS, Colgan JT, Husain MD, Howell PL, Mcintosh MK, Taylor QD, Sadeghi HM. Multicenter masked evaluation of AutocytePrep thin layers with matched conventional smears. Including initial biopsy results. *Acta Cytol*. 1998; 42: 189-197.
19. Ring M, Bolger N, O'Donnell M, Malkin A, Birmingham N, Akpan E, Mulcahy F, Turner MJ, Griffin M, O'Leary JJ. Evaluation of liquid-based cytology in cervical screening of high-risk populations: a split study of colposcopy and genito-urinary medicine populations. *Cytopathology*. 2002; 13(3): 152-159.
20. Negri G, Menia E, Egarter-Vigl E, Vittadello F, Mian C. ThinPrep versus conventional Papanicolaou smears in the cytologic follow-up of women with equivocal smears. *Cancer Cytopathology*. 2003; 99(6): 342-345.
21. Hodgson W, Kaplan JK, Rodriguez M, Mchale MT, Rose SG, Elkas CJ. The impact of converting to liquid-based cervical in a military population. *Gynecol Oncol*. 2005; 99(2): 422-426.
22. Longatto-Filho A, Pereira SMM, Di Loreto, C, Utagawa ML, Makabe S, Maeda MYS, Marques JA, Santoro CL, Castelo Filho A. DCS liquid-based system is more effective than conventional smears to diagnosis of cervical lesions: study in high-risk population whit biopsy-based confirmation. *Gynecol Oncol*. 2005; 97(2): 497-500.
23. Davey E, Assuncao J, Irwig L, Macaskill P, Chan SF, Richards A, Farnsworth A. Accuracy of reading liquid based cytology slides using the ThinPrep Imager compared with conventional cytology: prospective study. *BMJ*. 2007; 335(7609): 1-2.

Virulence-associated genes diversity in *Escherichia coli* O128 strains isolated in São Paulo, Brazil

Diversidade dos genes associados à virulência em cepas de *Escherichia coli* O128 isoladas em São Paulo, Brasil

RIALA6/1169

Ângela Maria Girardi DIAS^{1*}, Kinue IRINO², Elena KANO², Maria Aidê Mitiko Fukushima KATO², Tânia Aparecida Tardeli GOMES³, Luiz Rachid TRABULSI^{**}

*Corresponding author: Rua Julio Hanser, 49, CEP 18030-320, Sorocaba, SP/Brazil. Tel:(55-15) 3232-8684, FAX: (55-15)3232-8439, e-mail:angelagirardi@ial.sp.gov.br

¹Instituto Adolfo Lutz Sorocaba, Laboratório de Bacteriologia, São Paulo, SP/Brazil.

²Instituto Adolfo Lutz Central, Divisão de Biologia Médica, Seção de Bacteriologia, São Paulo, SP/Brazil.

³Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, São Paulo, SP/Brazil.

** "IN MEMORIUM"

Recebido: 19/05/2008 – Aceito para publicação: 29/08/2008

ABSTRACT

Hundred-three *Escherichia coli* strains of serogroup O128 were serotyped and examined for virulence-associated genes. The 59 representative strains of all serotypes were submitted to ribotyping. The serotypes O128:H35 (41.7%), O128:H2 (14.6%), O128:H (8.7%) and O128:H8 (6.8%) were the most frequently found. Serotype O128ab:H2 strains only carried the *eae* and *bfpA* sequences. These strains exhibited the LA-like adhesion pattern. Serotype O128ab:H8 strains and some non-motile strains reacted only with the *eae* probe, and they were classified as atypical EPEC. The O128:H35 strains corresponded to the enteroaggregative category. Enterotoxigenic strains were found among O128ac:H7, O128ac:H21, O128ac:H27 and O128ac:H strains. Clonal group A comprised the majority of virulence markers - harbouring strains, while clonal group B included mainly those strains devoid of any virulence marker.

Key words. *Escherichia coli*, Enteropathogenic *E.coli*, EPEC, Serotypes O128.

RESUMO

Foram estudadas 103 cepas de *Escherichia coli* do sorogrupo O128, quanto às características fenotípicas e genotípicas associadas à virulência. Cinquenta e nove cepas representantes de todos os sorotipos foram submetidas a ribotipagem. Os sorotipos mais frequentes foram O128:H35 (41,7%), O128:H2 (14,6%), O128:H (8,7%) e O128:H8 (6,8%). Diferentes grupos enteropatogênicos foram identificados. Somente as cepas do sorotipo O128:H2 foram positivas para as sondas *eae* and *bfpA* e apresentaram o padrão de adesão AL-like. Cepas do sorotipo O128:H8 e algumas imóveis reagiram apenas com a sonda *eae* e foram classificadas como EPEC atípicas. As cepas O128:H35 corresponderam à categoria enteroagregativa e os sorotipos O128:H7, O128:H21, O128:H27 e as cepas imóveis foram classificadas como enterotoxigênicas. Todas as cepas que apresentaram marcadores de virulência pertenciam ao grupo clonal A, enquanto que no grupo clonal B estavam incluídas as cepas desprovidas dos fatores de virulência pesquisados.

Palavras-chave. *Escherichia coli*, *E.coli* enteropatogênica, EPEC, Sorotipos O128.

INTRODUCTION

During the 1940's and 1950's, many outbreaks of infantile diarrhoea were epidemiologically linked to *Escherichia coli* throughout the world¹. Although such outbreaks have become substantially uncommon in developed countries, enteropathogenic *E.coli* (EPEC) is still the leading cause of acute childhood diarrhoea in developing countries. EPEC are recovered from more than 30% of acute diarrhoea affecting mainly infants under one year old in large Brazilian urban centres^{2,3}.

In addition to certain *E. coli* strains historically associated to outbreaks of diarrhoea, several other strains have also been incriminated as capable of causing diarrhoeal diseases, as demonstrated by further investigations carried out in many countries^{4,5,6}. In 1987⁷, the World Health Organization recognized as EPEC 12 *E. coli* serogroups: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, and O158.

Over the past several years, the use of HEp-2 and HeLa cells in culture and molecular techniques for studying the virulence characteristics of *E. coli* associated with diarrhoeal diseases led to the establishment of six diarrhoeogenic categories, and more recently of another one designated atypical EPEC^{8,9}. The main characteristics of these categories are: EPEC, localised adherence pattern (LA), and presence of the *eae* sequence and the EAF plasmid; Atypical EPEC, presence of *eae* and absence of EAF; Enterohemorrhagic *E.coli* (EHEC), production of Shiga toxins I or II or both; Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), production of heat-labile (LT) or heat-stable (ST) toxins or both; Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), invasiveness (INV) and keratoconjunctivitis in guinea-pig; Enteroaggregative *E. coli* (EAEC), aggregative adherence pattern (AA), and diffusely adherent *E.coli* (DAEC), diffuse adherence pattern (DA) and gene *daaC*. The pathogenicity of DAEC strains however is not well established.

In 1953, Taylor & Charter¹⁰ identified the first strain belonging to serogroup O128, which was isolated from a severely ill baby (Cigleris) and from several cases of infantile diarrhoea in the United Kingdom. Since then, strains of this serogroup have been isolated in association with outbreaks or sporadic cases of diarrhoea in many countries¹¹. Furthermore, it has been reported that O128 strains may have different virulence properties^{12,13,14,15}. In England and other European countries, Shiga toxin-producing strains are relatively frequent in this serogroup^{13,14}. The main purpose of this study was to determine the virulence properties and the association between serotypes and ribotypes of O128 strains isolated in São Paulo, Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains

A total of 103 *E. coli* strains of serogroup O128 was analysed. All strains were isolated from patients with diarrhoea at Instituto Adolfo Lutz (Central and Regional

Public Health Laboratories), São Paulo, Brazil, between 1977-1993. Of the 103 strains, 90 (87.4%) were isolated from 1 to 5 year old children. The strains were stored on nutrient agar slants and kept at room temperature. Strain Cigleris (serotype O128:H2), the prototype strain of serogroup O128, also included in this study, was provided by the International Reference Center for *E. coli* and *Klebsiella*, Copenhagen, Denmark.

Serotyping

Strains were grown on nutrient broth and streaked onto nutrient agar plates. Selected smooth colonies were tested for serogroup confirmation and subgroup O128ab and O128ac determination. H-antigens were determined after several passages on semi-solid medium. All antigens were determined following standard methods¹⁶ by using antisera prepared with type strains in the Enteric Section of Instituto Adolfo Lutz.

Hybridisation with DNA probes

All strains were tested by colony hybridisation as described by Maas¹⁷ using the following isotopically (α -³²P[dATP]) labelled DNA probes: *eae* (*E. coli* attaching and effacing gene); *bfpA* (bundle-forming pilus); EAF (EPEC adherence factor); EHEC (EHEC hemolysin); Stx1 (Shiga toxin 1); Stx2 (Shiga toxin 2); EAEC (enteroaggregative *E. coli* adherence plasmid); AAF/I and AAF/II (aggregative adherence fimbriae I and II); *astA* (enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin); *daaC* (diffusely adhering *E. coli*); INV (*E. coli* invasiveness); LT-I (*E. coli* heat-labile enterotoxin type I); LT-II (*E. coli* heat-labile enterotoxin type II); ST-Ih (heat-stable enterotoxin type I from *E.coli* of human origin); ST-Ip (heat-stable enterotoxin type I from *E. coli* of porcine origin), and *cdt* (cytolethal distending toxin)¹⁸.

Search for colonisation factors (CFA/I and CFA/II)

Was performed with bacteria cultivated in Casamino Acids-yeast extract medium and were determined following standard methods¹⁹.

β -phenylpropionic acid reaction (hydrocinnamic acid)

All strains were tested for hydrocinnamic acid degradation according to Ewing²⁰. Cultures were inoculated on the surface of a medium containing 0.02g of β -phenylpropionic acid (PPA) (Sigma, ST Louis, MO, USA), incubated at 37°C and examined daily for three days for development of a pink colour (positive reaction) in the medium.

Hemolysin production

Hemolysin production was searched for according to Beutin et al.²¹. *E. coli* U4/41 (serotype O4:K3:H5), producing α -hemolysin and *E. coli* E-Hly⁺ (serotype O157:H7), producing the EHEC hemolysin, were used as positive controls.

Heat-stable (ST) enterotoxin production assay

The infant mice assay described by Dean et al.²² was used for detection of ST-I in culture supernatants.

Search for cytolethal distending toxin

Strains were statically grown in Brain Heart Infusion Broth (Difco, Michigan) at 37°C for 48h. Supernatants were filtered through 0.22µm membranes (Millipore products, Bedford, Mass, USA) and diluted 1:4 in MEM (Modified Eagle Medium, Gibco) for inoculation of HeLa cells monolayers. Changes in cell morphology were surveyed every 24h for 5 days. All strains were tested in two experiments. Two positive control strains (*E. coli* 86-6136 and 741-4) and a negative control strain (*E. coli* C600) were used in all assays²³.

HeLa cells adhesion assay

Strains were tested for the ability to adhere to HeLa cells in the presence of D-mannose as previously described, using the 3 and 6 h assays²⁴. Adherence patterns were determined by comparison with those of strains *E. coli* E2348/69, C1845, and O42, which are prototypes for localised adherence (LA), diffuse adherence (DA), and aggregative adherence (AA), respectively^{25,26,27}. The adherence patterns were defined after the strains had been tested at least in two assays.

Ribotyping and clonal analysis

Chromosomal DNA (2µg) extracted and purified according to Brenner et al.²⁸ was digested with *Bgl*II and *Hind*III (Amersham Pharmacia Biotech) following the instructions of the manufacturer. Electrophoresis of digested DNA samples and transfer to nylon membranes were done as described elsewhere²⁹. Hybridization of membranes with 16 + 23S cDNA probe was done according to Popovic et al.³⁰. Fragment sizes of hybridized DNA were estimated as described by Dalla-Costa et al.³¹. A similarity matrix was constructed by visually scoring the presence or absence of each fragment (0, absence of a fragment; 1, presence of a fragment for each ribotype) and the dendrogram was constructed as previously described^{18,32}.

RESULTS

Serotyping

Among the 103 strains, 70 (67.9%) were of subgroup O128ab and 33(32,1%) of subgroup O128ac. Nine strains were non-motile (H-) and the remaining harboured one of the following H-antigens: H2, H5, H7, H8, H12, H21, H25, H27, and H35. Some serotypes occurred with O128ab, others with O128ac and others with both O antigenic varieties. The most prevalent serotype found in the study period was O128ab:H35 (38.8%). The frequencies in which the different associations between H-types and ab and ac antigens occurred are presented in Table 1.

Virulence properties

None of the 103 strains produced hemolysin or reacted with the EAF, *daaC*, EHEC, Stx1, Stx2, LT-I, LT-II, ST-Ip, INV, AAF/I, and AAF/II probes. The results obtained with the remaining probes as well as the toxin production and adherence patterns are summarised in Table 1, according to the ab and ac O subgroups and H-types. All strains of serotypes O128ab:H5, O128ac:H8 and O128ac:H25 were devoid of any of the virulence properties tested and presented an indefinite pattern of adherence (IN) to HeLa cells. Strains carrying antigens H7, H8, H12, and non-motile strains of sub-group ab presented virulence properties distinct from those presented by strains of sub-group ac of the same serotype. The *eae* sequence was found only in strains of serotypes O128ab:H2 (86.6% of the strains), O128ab:H8 (50.0%), and O128ab:H- (100%). The majority of strains of the former serotype that carried *eae* also carried *bfpA*. 68.2% of the strains presenting *eae* produced the localised adherence-like pattern of adherence (LAL) described by Rodrigues et al.¹⁸, which was characterised by loose clusters of few bacteria detected only in the prolonged 6h assay (Figure 1A). The ST-Ih sequence was found only in strains belonging to the ac subgroup (in one of 3 strains of O128ac:H7, in all strains of O128ac:H-, in all strains of O128ac:H21 and 3 of 10 strains of O128ac:H27), and all of them expressed ST-I in the infant mouse assay. Moreover, the 2 strains of serotype O128ac:H7, 5 strains of serotype O128ac:H12 and 7 strains of serotype O128ac:H27 that lacked the ST-Ih sequence were also positive in this assay at the time of isolation. Among the ST-Ih producing strains, one (serotype O128ac:H7) produced CFA/I and two (serotype O128ac:H21) produced CFA/II. All O128ac:H- and O128ac:H21 strains that produced ST-Ih displayed DA (Figure 1C). The EAEC sequence was found only in serotype O128ab:H35 (15% of these strains), but most of the strains of this serotype (82.5%) presented AA to HeLa cells (Figure 1B). This pattern was also detected in the two strains of serotype O128ab:H12 and one of 3 strains of serotype O128ac:H35. The AA pattern in all O128 strains could only be determined in the 6h assay. The *cdt* sequence was only found in one O128ab:H- strain which did not express the toxin; in the same serotype, another strain produced CDT but did not react with the *cdt* probe used. Most of the strains of serotypes O128ab:H2 (73.3%), O128ab:H35 (72.5%), and O128ac:H35 (66.6%) carried sequences homologous to *astA*.

β-phenylpropionic acid reaction

Only strains belonging to serotypes O128ab:H2 (13 strains) and O128ab:H- (4 strains) and bearing the *eae* gene were positive in this test.

Ribotypes

For ribotyping analysis we selected 59 strains that represented all serotypes and subgroups identified in this study. Using DNA digested with *Bgl*II and *Hind*III, 8 banding patterns (ribotypes R1 to R8) were found among these strains

(Figure 2). The distribution of strains according to the ribotypes associated with serotypes and their virulence properties is shown in Figure 3.

DISCUSSION

The results of this study show that *E. coli* serogroup O128 include strains with the characteristics of atypical EPEC

(*eae*⁺), enterotoxigenic *E. coli* (ST-Ih⁺), and enteroaggregative *E. coli* (AA adherence pattern). This serogroup also includes strains as those of serotype O128:H2 (*eae*⁺, *bfp*⁺, and EAF⁻) which can not be placed in any of the diarrheogenic *E. coli* categories. In fact O128:H2 strains are very similar to O119:H2³³ strains and were classified as atypical EPEC³⁴. Most strains of this serotype carried the *astA* gene. Surprisingly enough we have not found among our O128:H2 strains either Stx or EAF positive strains. Although the number of strains studied is not

Table 1. H-antigens, O subgroups and virulence characteristics of 103 O128 *E. coli* isolated in São Paulo, Brazil, between 1977 and 1993.

H-types	O subgroup	Virulence properties	Adherence pattern
H2 (15) ^a	ab (15)	<i>eae bfpA astA</i> (11)	LAL (9) ; IN (2)
		<i>eae bfpA</i> (1)	LAL (1)
		<i>eae</i> (1)	LAL (1)
		# (2)	IN (2)
H5 (1)	ab(1)	#(1)	IN (1)
H7 (4)	ab (1)	# (1)	IN(1)
	ac (3)	ST-Ih ^c (1)*	IN (1)
	# (2)	# (2)	IN (2)
H8 (6)	ab (5)	<i>eae</i> (3)	LAL (1) ; IN (2)
	# (2)	# (2)	LAL(1) ; NA (1)
	ac (1)	# (1)	IN (1)
H12 (7)	ab (2)	# (2)	AA (2)
	ac (5)	# (5)	IN (4) ; NA (1)
H21 (6)	ac (6)	ST-Ih ^c (6)**	DA (6)
H25 (2)	ac (2)	# (2)	IN (2)
H27 (10)	ac (10)	ST-Ih ^c (3)	NA (3)
		# (7)	NA (7)
H35 (43)	ab (40)	EAEC (4)	AA (4)
		EAEC <i>astA</i> (2)	AA (2)
		<i>astA</i> (27)	AA (21) ; IN (6)
		# (7)	AA (6); IN (1)
		<i>astA</i> (2)	AA (1); IN (1)
H ^{-b} (9)	ac (3)	# (1)	IN (1)
		<i>eae</i> (4)	LAL (3); IN (1)
		<i>eae cdt</i> (1)	IN (1)
ac (3)	<i>eae astA</i> CDT (1)	IN (1)	
	ST-Ih ^c (3)	DA (3)	

^a (number of strains); ^b (non-motile); ^c (all strains which reacted with this probe were positive for ST(Dean test); * (positive for CFA/ I, colonization factor antigen I) ; ** (two strains were positive for CFA/II, colonization factor antigen II); *eae* (EPEC attaching and effacing); *bfpA* (bundle forming pilus); *ast-A* (enteroaggregative heat-stable enterotoxin I gene); ST-Ih (heat-stable enterotoxin I from *E. coli* of human origin); EAEC (enteroaggregative *E. coli*); *cdt* (cytolethal distending toxin gene); CDT (cytolethal distending toxin); # (negative with all probes); LAL (localized adhesion like) ; AA (aggregative adhesion); DA (diffuse adhesion) ; IN (indefinite adhesion) ; NA (non-adherent)

large this suggests that the Brazilian O128:H2 strains are different from the strains isolated in the UK and other European countries where strains of this serotype frequently produce Stx and occasionally bear the EAF plasmid^{13,14}.

An interesting result of this study was the close association found between antigenic characteristics and virulence properties. Strains carrying antigens H7, H8, H12, H35 and some non-motile strains of sub-groups ab presented virulence factors distinct from those presented by strains of

sub-group ac of the same serotype. Still interesting yet, strains bearing the *eae* and EAEC sequences and those displaying AA belonged to sub-group ab, while strains which reacted with the ST-Ih probe or produced this toxin were of sub-group ac. Similar results were reported by Campos et al.³² with serogroup O111 where all EPEC (typical and atypical) and all aggregative strains had the ab antigen and all STEC strains had ac antigens.

The subdivision of O groups in ab and ac subgroups, introduced by Ewing et al.³⁵ in the 50's, may be more significant than accepted currently not only for virulence but also in epidemiological studies⁴. In regard to these phenotypical characteristics, it should be emphasized that the phenylpropionic acid test, could separate the O128:H2 strains from all other strains suggesting that this serotype can be identified by this property.

The use of the adherence assay in this study was crucial for the characterisation of the strains since it demonstrated the existence of a great number of EAEC strains which could not be detected by the EAEC DNA probe currently available^{36,37} and also because it allowed us to confirm that strains lacking the EAF region exhibit regularly the LAL adherence pattern. But it should be noted that the results of the assay for both adherence patterns are consistent only after a 6 hour incubation period.

Clonal analysis based on ribotyping data showed that O128 strains are organized in two main groups comprising some clusters. The great majority of strains bearing virulence markers were assigned to clonal group A. Our finding that R2 included serotypes H2, H27 and H35 is similar to the data reported by Whittam et al.³⁸ who showed that these serotypes belonged to a single electrophoretic type (ET). Although one cluster typically included ETEC strains of serotypes O128:H7,

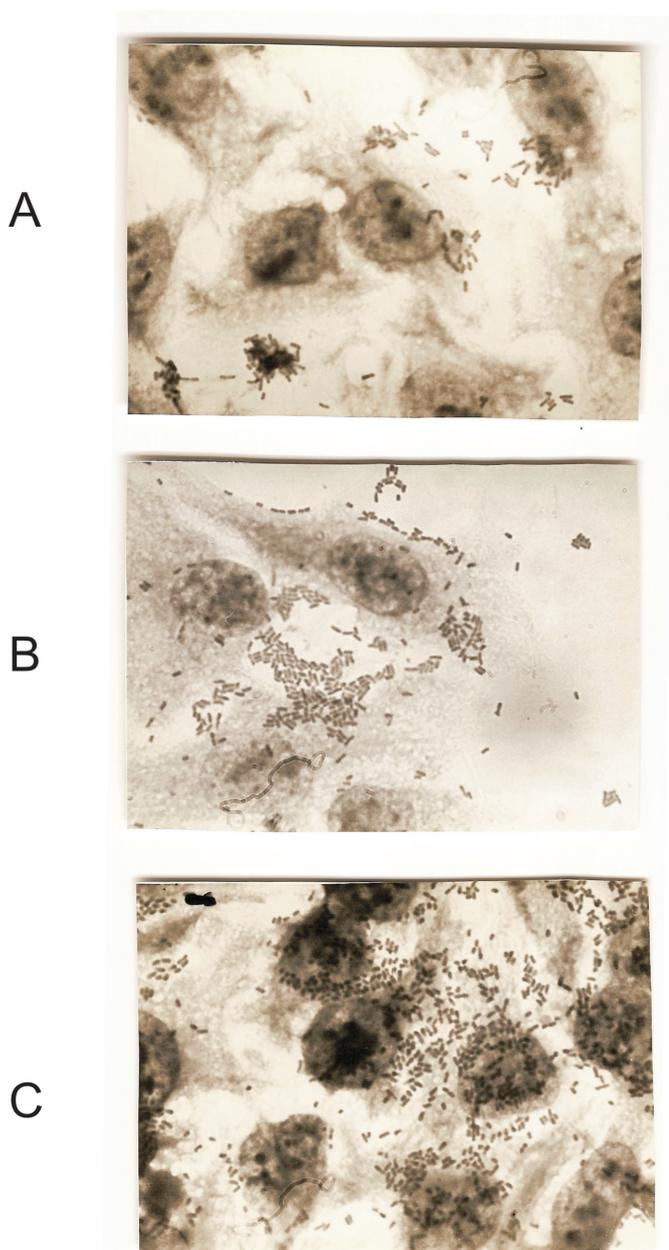


Figure 1. Adherence patterns of O128 strains after 6h incubation. (A) Localized adherence-like pattern (LAL) of O128:H2 strains; (B) AA pattern displayed by O128:H35 strains; (C) DA pattern of O128ac:H21 strains.

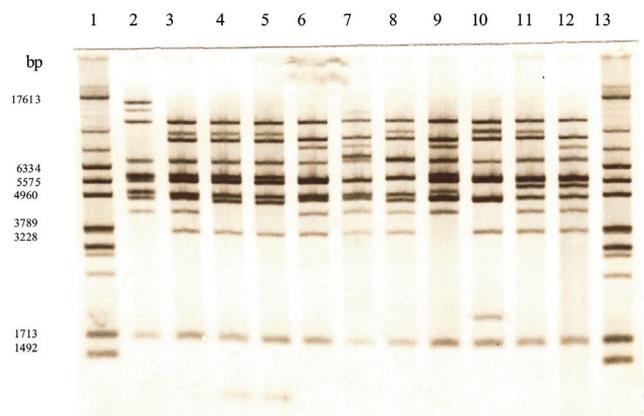


Figure 2. Banding patterns (ribotypes) of 59 O128 strains obtained with *Bgl*I. 1 and 13, molecular marker, *H. aegyptius* EcoRI DNA digest; 2, ribotype 1 (Cigleris, H2); 3, ribotype 2 (H2); 4 and 5, ribotype 3 (H-); 6, ribotype 4 (H7); 7, ribotype 4a (H7); 8, ribotype 5 (H8); 9, ribotype 6 (H12); 10, ribotype 7 (H25); 11, ribotype 8 (H21); 12, ribotype 8a (H21)

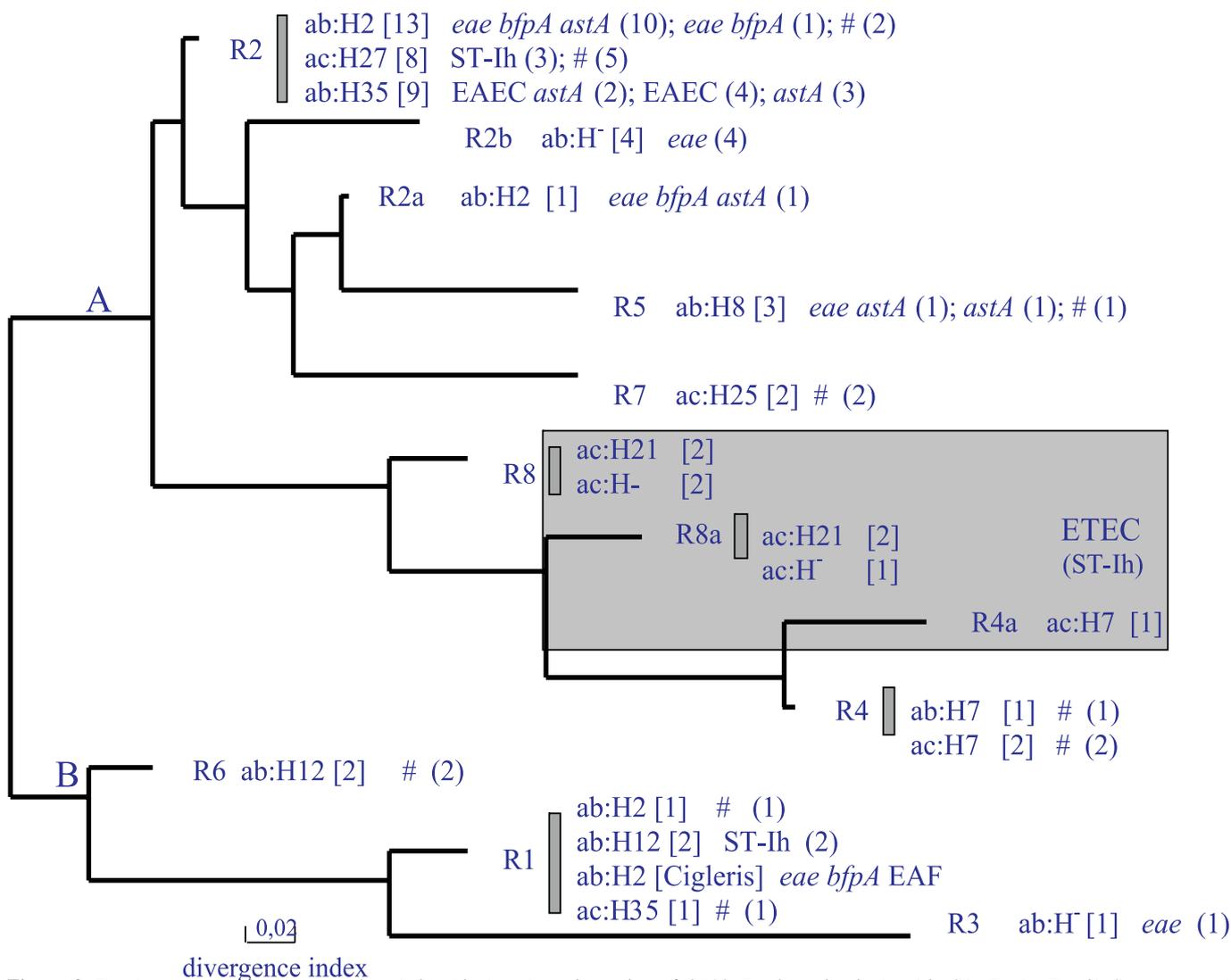


Figure 3. Dendrogram showing the genetic relationship based on ribotyping of O128 *E.coli* strains isolated in São Paulo, Brazil. Serotypes and characteristic virulence determinants are indicated on the right of each ribotype. When multiple strains were analysed the number of strains are indicated in parentheses following the virulence markers. # indicates absence of any virulence marker.

O128:H21 and non-motile strains, other enterotoxigenic serotypes as O128ac:H27 and O128ac:H12 were classified in other clusters, suggesting that strains belonging to the same diarrhoeagenic category are not monophyletic³⁹. Clonal group B included mainly strains devoid of any virulence marker except for one non-motile strains carrying the *eae* sequence and two O128ac:H12 strains that were originally ST-Ih positive, but lost this virulence marker possibly during storage. The prototype strain “Cigleris” (O128:H2 *eae bfpA* EAF) was also assigned in this group suggesting its substantial genotypic difference compared with our H2 strains,

and supporting that strain Cigleris, a O128:H2 strain isolated in England many years ago, likely belongs to a different lineage or clone. Genetic diversity among O128:H2 strains has already been reported by Whittam et al.³⁹ and Orskov et al.⁴⁰ based on electrophoretic profiles. Similar distribution based on multilocus enzymes electrophoresis (MLEE) has been reported in other EPEC serogroups^{14,16,29}, showing a close relationship among electrophoretic types, serotypes and virulence properties. Dalla-Costa et al.³¹ also reported an association between ETs and ribotypes in many EPEC serogroups.

ACKNOWLEDGMENTS.

This work was supported by grants 62.02366/92-2 (PADCT/CNPQ) and 92/4890-2 (FAPESP) awarded to L.R.T. We are very grateful to Josias Rodrigues for the construction of the dendrogram.

REFERENCES

1. Robins-Browne, RM. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev Infect Dis.* 1987; 9:28-53.
2. Gomes, TAT, Griffin PM, Ivey C, Trabulsi LR and Ramos SRTS. EPEC infections in São Paulo. *Rev Microbiol, São Paulo*, 1996; 27 (Suppl.1): 25-33.
3. Franzolin MR, Alves RCB, Keller R, Gomes TAT, Beutin L, Barreto ML, Milroy C, Strina A, Ribeiro H, Trabulsi LR. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100:359-63.
4. Ewing WH, Tatum HW and Davis BR. The occurrence of *Escherichia coli* serotypes associated with diarrheal disease in the United States. *Public Health Laboratory.* 1957;15:118-38.
5. Tamura K, Sakazaki R, Murase M and Kosako Y. Serotyping and categorisation of *Escherichia coli* strains isolated between 1958 and 1992 from diarrhoeal disease in Asia. *J. Med. Microbiol.*1996;45:353-8.
6. Nguyen TV, Van PL, Huy CL, Gia KN, Weintraub A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol.*2005;43:755-60.
7. World Health Organization. Programme for Control of Diarrhoeal Diseases. Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections. World Health Organization, Geneva 1987.
8. Kaper, J. B. Defining EPEC. *Rev. Microbiol., São Paulo* 1996; 27 (Suppl.1):130-3.
9. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiol.* 2004;2:123-40.
10. Taylor J, Charter RE. *Escherichia coli* O128 causing gastroenteritis of infants. *J Clin Pathol.*1955; 8:276-81.
11. Orskov F, Orskov I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol.*1992; 38:699-704.
12. Guth BEC, Silva MLM, Scaletsky ICA, Toledo MRF, Trabulsi LR. Enterotoxin production, presence of colonization factor antigens I, and adherence to HeLa cells by *Escherichia coli* O128 strains belonging to different O subgroups. *Infect Imm.*1985;47:338-40.
13. Giammanco AM, Maggio G, Giammanco R, Morelli R, Minelli F, Scheutz F and Caprioli A. Characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic *E.coli* serogroups isolated in Italy from children with diarrhea. *J Clin Microbiol.*1995;34:689-94.
14. Scotland SM, Willshaw GA, Smith HR, Said B, Stokes N, Rowe B. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O26, O55, O111 and O128 isolated in the United Kingdom in 1991 from patients with diarrhoea. *Epidemiol Infect.*1993;111: 429-39.
15. Dulguer MV, Fabbriotti SH, Bando SY, Moreira-Filho CA, Fagundes-Neto F, Scaletsky ICA. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E.coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. *J Infect Dis.*2003; 188:1685-94.
16. Ewing WH. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Publishing Co., Inc., New York 1986.
17. Maas R. An improved colony hybridization method with significantly increased sensitivity for detection of single genes. *Plasmid* 1983;10: 296-8.
18. Rodrigues J, Scaletsky ICA, Campos LC, Gomes TAT, Whittam TS, Trabulsi LR. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infect Immun.* 1996; 64: 2680-6.
19. Evans Jr DJ, Evans DG. Classification of pathogenic *Escherichia coli* according to serotype and the production of virulence factor, with special reference to colonization factor antigens. *Rev Infect Dis.* 1983; 5:692-701.
20. Edwards PR, Ewing WH. Identification of *Enterobacteriaceae*. Burgess Publishing Co., Minneapolis 1972.
21. Beutin L, Prada I, Zimmermann S, Støpner R, Orskov I, Orskov F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E.coli* (EPEC). *Zentralb. Bakteriell Hyg Reihe.* 1988; A 267:576-88.
22. Dean AG, Ching YC, Williams RG, Harden LB. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice; application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J Infect Dis.*1972;125:407-11.
23. Johnson WM, Lior H. A new heat labile cytolethal distending toxin (CDT) produced by *Escherichia coli* isolated from clinical material. *Microbiol Pathog.* 1988 4:103-13.
24. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol.*1979; 3:95-9.
25. Baldini MM, Kaper K, Levine MM, Candy DCA, Moon HW. Plasmid adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1983; 2:534-8.
26. Bilge SS, Clausen CR, Lau W, Moseley S. Molecular characterization of afimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *E.coli* to HEP-2 cells. *J Bacteriol.* 1989;171:4281-9
27. Vial PA, Robins-Browne R, Lior H, Prado V, Kaper JB, Nataro JP, Maneval D, Elsayed A, Levine MM. Characterization of Enteroadherent-Aggregative *Escherichia coli* a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis.*1988;158:70-9.
28. Brenner DJ, McWhorter AC, Knutson JKL, Steigerwalt AD. *Escherichia vulneris*: a new species of *Enterobacteriaceae* associated with human wounds. *J Clin Microbiol.* 1982;15:1133-46.
29. Southern EM. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.*1975; 98:503-17.
30. Popovic T, Bopp CA, Olsvik O, Wachmuth K. Epidemiologic application of a standardized ribotype scheme for *Vibrio cholerae* O1. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2474-82.
31. Dalla-Costa LM, Irino K, Rodrigues J, Rivera ING, Trabulsi LR. Characterization of diarrheagenic *E.coli* clones by ribotyping and ERIC-PCR. *J Med Microbiol.*1998; 47:227-34.
32. Campos LC, Whittam TS, Gomes TAT, Andrade JRC and Trabulsi LR. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. *Infect Imm.* 1994;62:3282-8.
33. Gonçalves AG, Campos LC, Gomes TAT, Rodrigues J, Sperandio V, Whittam TS and Trabulsi LR. Virulence properties and clonal structure of strains of *E.coli* O119 serotypes. *Infect Immun.* 1997;65:2034-40.
34. Nguyen RN, Taylor LS, Tauschek M, Robins-Browne RM. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerg Infect Dis.*2006;12:597-603.
35. Ewing WH, Davis BR, Montague TS. Studies on the occurrence of *Escherichia coli* serotypes associated with diarrheal disease. Atlanta, GA. U.S. 1963, Department of Health, Education and Welfare.
36. Baudry B, Savarino SJJ, Vial P, Kaper JB, Levine MM. A sensitive and specific DNA probe to identify Enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. *J Infect Dis.*1990; 161: 1249-51.
37. Nataro JP. Non-EPEC *E.coli* that adhere to HEP-2 cells. *Rev Microbiol., São Paulo* 1996; 27 (suppl.1): 67-71.
38. Whittam TS, McGraw EA. Clonal analysis of EPEC serogroups. *Rev Microbiol., São Paulo* 1996;27 (Suppl.1): 7-16.
39. Whittam TS, Wolfe ML, Wachmuth IK, Orskov F, Orskov I, Wilson RA. Clonal relationship among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun.* 1993 ;61: 1619-29.
40. Orskov F, Whittam TS, Cravioto A, Orskov I. Clonal relationships among classic enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) belonging to different O groups. *J Infect Dis.*1990;162:76-81.

ISSN 0073-9855



9 770073 985009