

ISSN 0073-9855

# REVISTA do INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ESTA REVISTA FOI CONFECCIONADA COM  
RECURSOS DA EDITORA LETRAS & LETRAS



RIALA 6

VOLUME 58

NÚMERO 1

1999

*Letras & Letras*<sup>®</sup>

# **INSTITUTO ADOLFO LUTZ**

---

## **DIRETOR RESPONSÁVEL**

Dr. Cristiano Corrêa de Azevedo Marques  
Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

## **COMISSÃO DE REDAÇÃO**

KIMIYO NONOYAMA, Presidente  
NEUS SADOCCO PASCUET  
MARIA ALICE DA SILVA TELLES  
MARIA LUISA BARBOSA  
MARIANGELA TIRICO AURICCHIO  
MÔNICA ARCON BATISTIC  
PEDRO LUIZ SILVA PINTO  
RAIMUNDA TELMA DE MACEDO SANTOS  
REGINA GOMES DE ALMEIDA  
REGINA M. MORELLI SILVA RODRIGUES  
THAÏS VALÉRIA MILANEZ, Secretária

## **SETOR DE PUBLICAÇÕES**

ROCELY A. DE SOUZA BUENO

---

## **PRODUÇÃO**

EDITORA LETRAS & LETRAS LTDA.

EDITOR  
Carlos José Linardi

Endereço/ Address  
Av. Ceci, 1945 – São Paulo  
CEP 04065 – 003  
Fone/Fax: (011) 577-5746 ou (011) 5581-2183  
e-mail: letras@uol.com.br

---

Endereço/ Address

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz  
Av. Dr. Arnaldo, 355  
01246 – 902 – São Paulo – SP  
(Caixa Postal, 1783 – CEP – 01059-970)

Publicação semestral/ Bi-annual publication  
Solicita-se permuta/ Exchange desired

---

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

1941 — 1999, 1-101  
1999, 58 (1)

ISSN 0073-9855

RIALA 6

CDD<sub>18</sub> 614.07205

---

(\*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. *Normas para catalogação de publicações seriadas nas bibliotecas 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.

## AOS COLABORADORES

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

Os artigos destinados à REVISTA somente serão recebidos se redigidos de acordo com as seguintes normas:

## NORMAS PARA A PUBLICAÇÃO

Os trabalhos deverão ser apresentados na forma de artigos ou comunicações científicas, em português, em três vias, sendo uma completa e as outras duas omitindo os nomes dos autores e respectivas instituições, tanto na página de rosto quanto nos resumos em português e inglês. O trabalho, após aprovado, deve ser encaminhado ao Setor de Publicações, em uma cópia impressa e um em disquete 3 1/2", indicando o editor de texto utilizado. Artigos em inglês poderão ser aceitos, a critério da Comissão de Redação das Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz.

Na elaboração do artigo, será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura:

### *Página de rosto*

Título do Artigo  
Nome do(s) autor(es)  
Filiação científica

### *Texto*

Título  
Autores  
Resumo em português  
Descritores em português  
Introdução  
Material e Métodos  
Resultados  
Discussão  
Conclusões  
Agradecimentos (se for o caso)

Títulos em inglês  
Resumo em inglês  
Descritores em inglês  
Referências bibliográficas

**TÍTULO** - Deverá ser curto e específico, indicando precisamente o conteúdo do artigo; no caso de ser necessário um título longo, recorrer a substituí-lo.

**ABREVIATURAS** - Não serão empregadas nos títulos ou nos resumos. No texto, serão evitadas ou usadas apenas as oficiais, já consagradas.

**UNIDADES DE MEDIDA E SEUS SÍMBOLOS** - Deverão ser usadas somente as últimas legais de medir do Sistema Nacional de Metrologia (BRASIL. Leis, decretos, etc. - Resolução nº 11, de 12 de outubro de 1988, do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Diário Oficial, Brasília, 21 out. 1988. Seção I, pt. 1, p.20524-32. Aprova a Regulamentação metrológica que com esta baixa revoga a Resolução nº 01/82, de 27 de abril de 1982).

**TABELAS** - Serão numeradas consecutivamente, com números arábicos e encabeçadas pelos respectivos títulos, que deverão indicar claramente o conteúdo. Os dados apresentados em tabela não deverão ser repetidos em gráficos, a não ser em casos especiais. Na montagem das tabelas, seguir as normas brasileiras para apresentação tabular (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA — Normas de apresentação tabular, Rio de Janeiro, IBGE, 1979, 22p.)

Na ausência de um dado numérico, empregar os seguintes sinais convencionais:

- (-) Quando pela natureza do fenômeno, não puder existir o dado;
- (z) Quando o dado for rigorosamente zero;
- (...) Quando não se dispuser do dado;
- (0.0) Quando a aplicação dos critérios de arredondamento não conseguir alcançar, respectivamente, os valores 1; 0,1; 0,01, etc. ;
- (x) Quando o dado for omitido para evitar a individualização da informação.

**ILUSTRAÇÕES** ( fotografias, gráficos, desenhos, mapas etc.) — Serão designadas no texto como "Figuras": terão numeração única e seguida, em algarismos arábicos.

Todas as ilustrações deverão ser identificadas com: número, nome do autor, título do artigo e número da página do texto onde serão inseridas; deverão ser tão claras que permitam sua reprodução com redução de 6,5 cm no sentido da largura, sem perda de nitidez ou legibilidade; as respectivas legendas deverão estar escritas fora da área de reprodução.

Os gráficos, mapas e desenhos deverão ser feitos à nanquim preta, com papel vegetal, com letras e números escritos com normógrafos.

As fotografias deverão ser nítidas e de bom contraste. No caso de diapositivos, estes serão apresentados e não fotografias dos mesmos.

**RESUMOS** - Serão apresentados 1, em português, antecedendo o texto, outro, em inglês (encabeçado pelo título do artigo), no final, antes das referências bibliográficas. Não deverão exceder 200 palavras. O estilo será claro e conciso, pondo em relevo, de forma precisa, os fatos observados e os elementos novos essenciais à conclusão. Serão redigidos pelo próprio autor ou com colaboração deste, observando-se recomendações da UNESCO (Bol. UNESCO Bibl. 23: 72-7, 1969). A fim de facilitar a indexação, o resumo deverá conter:

**DESCRITORES** - Palavras ou expressões que identifiquem o conteúdo do artigo. Os três principais descritores serão escritos em primeiro lugar, por ordem de importância. Recomendam-se para a escolha dos descritores, usar o vocabulário próprio do campo especializado.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** - Deverão ser mencionadas somente as de trabalhos consultados diretamente ligados ao assunto.

*No texto* - serão citadas por meio de número índice correspondente ao da lista de referências, escritas em versal; assim, para um autor... TAUNAY<sup>11</sup> verificou.....; para dois autores..... LEME & CARRIJO<sup>10</sup>, pesquisando.....; para mais de dois autores: no trabalho de TSUNODA et alli<sup>6</sup>; ou ainda... Segundo vários autores<sup>1,3,7,8</sup>.

Na lista de referências - terão numeração consecutiva e serão ordenadas alfabeticamente pelo último sobrenome do autor (regra geral). Todos os autores do artigo deverão ser citados.

Para artigos periódicos

Último sobrenome do(s) autor(es) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título do artigo, título do periódico, abreviado (WORLD list of scientific periodicals, published in the years 1900 — 1960; edited by Peter Brown and George Burder Stratton, 4 ed., London, Butterworths, 1963 — 1965, 3 v.) em grifo, nº do volume, nº do fascículo (quando a numeração não for continuada), páginas inicial e final do artigo, data da publicação do volume do fascículo.

Ex.:

MORENO, G.; LOPES, C.A.M.; BELLOUMINI, H.E.; PESSOA, G.V.A.; BLASI, P. & ANDRADE, J.C.R.  
Enterobactérias isoladas de anfíbios e répteis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 15: 122-126, 1973.

Para livros

Último sobrenome do(s) autor(es) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título da obra (em grifo), no da edição (se não for a primeira), local de publicação, editor (quando não coincidir com o autor), ano de publicação, no de páginas ou volumes (ou no da página consultada).

Ex.: CANTAROW, A. & SHEPARTZ, B. — *Bioquímica*, 3ª ed. Guanabara, Atheneu, 1968, p. 325.

## DA PUBLICAÇÃO

1. Os trabalhos destinados à publicação na *Revista do Instituto Adolfo Lutz* deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz, Setor de Publicações.
2. A publicação de artigos na *Revista* está condicionada à aprovação da Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz, que poderá sugerir ao autor alterações no original. Este original só será aceito quando tiver o visto desta comissão.
3. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.
4. Os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de aprovação, salvo o caso especial denota prévia, que terá prioridade.
5. A data de recebimento do artigo constará obrigatoriamente no final do mesmo.
6. A primeira prova tipográfica será revisada pelo redator - secretário e conferida pelo autor, que a rubricará.
7. Os originais de trabalhos aceitos para publicação não serão devolvidos aos autores.
8. Os autores terão direito a 20 separatas; quando desejarem maior número, deverão entender-se com o redator - secretário da Revista.
9. É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, de conformidade com a legislação sobre direitos autorais.

## DA DISTRIBUIÇÃO

A *Revista Adolfo Lutz* além de ser vendida é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais, ou em permuta com periódicos nacionais ou estrangeiros.

---

Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(1), 7-103, 1999

---

ARTIGOS ORIGINAIS/ ORIGINAL ARTICLES

SUMÁRIO/CONTENTS

- 844 Surto de toxinfecção alimentar causado pela ação simultânea de enterotoxina Estafilocócica e *Salmonella enteritidis* — estudo de caso.  
— Outbreak of food toxic infection caused by simultaneous action of Staphylococcal enterotoxin and *Salmonella Enteritidis*  
Ricardo Souza DIAS, Luiz Simeão do CARMO & Maria Crisolita Cabral da SILVA ..... 7-11
- 845 Salmonelas isoladas de queijos tipo “coalho”: Caracterização sorológica e resistência a agentes antimicrobianos — Recife (PE).  
— *Salmonella* Isolated from “curd” of cheese: serological characterization and resistance to antimicrobial agents — Recife (PE)  
Maria José de SENA, Mônica M. O. P. CERQUEIRA, Deise A. dos SANTOS, Geraldo LEOCADIO FILHO & Ricardo Souza DIAS ..... 13-17
- 846 Pudins dietéticos e convencionais: Avaliação das informações nutricionais contidas em suas rotulagens.  
— Dietetic and conventional puddings: Evaluation of nutritional information that these labels contain  
Maria Lima GARBELOTTI, Maria A. de Brito RODAS, Sonia Tucunduva PHILIPPI & Andrea Romero LATTERZA ..... 19-24
- 847 Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de compostos derivados do ácido isonicotínico frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.  
— Minimal Inhibitor Concentration and Minimal Bactericidal Concentration determination of isonicotinic acid derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*.  
Daisy Nakamura SATO, Catarina Terezinha M. BACHA, Daniel BÖTTCHER, Maria Clarice ERRERA, Pablo PRESOTTO & Carmo Elias Andrade MELLES ..... 25-31
- 848 Avaliação do diagnóstico laboratorial da Doença Meningocócica pelos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz.  
— Presence of na Endogeno Laboratorial diagnosis evaluation of meningococcal disease by the regional laboratories of Instituto Adolfo Lutz.  
Marilu Mendes Moscardini ROCHA, Maria Regina Novaes Ramires ESPER, Suzel Nogueira NEME, Marta Inêz Cazentini MEDEIROS, Regina Ruivo Ferro e SILVA, Antonio Luiz Vicente ARREAZA, Waldemar EBNER FILHO, Ivete A. Zago Castanheira de ALMEIDA, Margarida Geogina BASSI & Eliani ARAÚJO ..... 33-39
- 849 *SALMONELLA*: determinação de sorotipos e resistência a agentes antimicrobianos de cepas isoladas de carcaças de frango comercializados na região de São José do Rio Preto — S.P

- *SALMONELLA*: Serotyping and antimicrobial susceptibility patterns of strains isolated from chicken carcass samples commercialized in São José do Rio Preto area — SP.  
Jacqueline Tanury Macruz PERESI, Ivete Aparecida Zago Castanheira de AIMEIDA, Sonia Aparecida de LIMA, Sueli Aparecida FERNANDES, Ana Terezinha TAVECHIO & Dilma Scala GELLI ..... 41-46
- 850 Observações Laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp, ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997.  
— Laboratorial observation about foodborne salmonellosis outbreaks in Great São Paulo city, from 1994 to 1997.  
Miyoko JAKABI, Adriana Aparecida BUZZO, Christiane Asturiano RISTORI, Ana Terezinha TAVECHIO, Harumi SAKUMA, Ana Maria Ramalho de PAULA & Dilma scala GELLI ..... 47-51
- 851 A Survey of the occurrence of aflatoxins in groundnuts (peanuts) and groundnut products in São Paulo state/Brazil in 1994.  
— Dados de ocorrências de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim no estado de São Paulo/ Brasil em 1994.  
Myrna SABINO, Emiko Ikejiri INOMATA, Leda Conceição Antonia LAMARDO, Thaís Valéria MILANEZ, Sandra Aparecida NAVAS & Maria Ângela Pompeu ZORZETTO ..... 53-57
- 852 Atividade da violaceína in vitro sobre o *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra.  
— In vitro Activity of violacein against *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra.  
Ana Olivia de SOUZA, Dalva Cristina Girello AILY, Daisy Nakamura SATO & Nelson DURÁN .... 59-62
- 853 Surto de meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*.  
— An outbreak of *Listeria monocytogenes* meningitis in neonates.  
Ilka Maria LANDGRAF, Alice Massumi Mori KOBATA, Miyoko JAKABI, Candida Rosa Alves KIRSCHBAUM & Cássia Rita MARCHI ..... 63-67
- 854 Defumação líquida da Anchova (*Pomatomus saltatrix*): estabilidade lipídica durante o processamento e o armazenamento.  
— Liquid smoking of blue fish (*Pomatomus saltatrix*): lipid stability during processing and storage.  
Alex Augusto GONÇALVES & Carlos PRENTICE-HERNÁNDEZ ..... 69-78
- 855 Detecção e tipagem de vírus Dengue sorotipos 1 e 2 por multiplex RT-PCR  
— Multiplex RT-PCR used for detection and tipication of Dengue viruses serotypes 1 and 2.  
Maria Luisa BARBOSA ..... 79-83
- 856 Avaliação microbiológica e físico-química do leite pasteurizado comercializado na Região de São José do Rio Preto-SP  
— Microbiological and Physicochemical Evaluation of the Pasteurized Milk traded in the Region of São José do Rio preto-SP  
Cecília Cristina Marques dos SANTOS, Jacqueline Tanury Macruz PERESI, Maria do Rosário Vigeta LOPES, Sônia Isaura de LIMA, Inara Siqueira de CARVALHO & Odair ZENEBON ..... 85-89
- 857 Análise por cromatografia gasosa de anfetaminas e benzodiazepinas em formulações para emagrecimento. Estudo I: determinação de dietilpropiona e femproporex.  
— Gas chromatography analysis of amphetamines and benzodiazepines in formulas for slim. Study I: determination of diethylpropion and fenproporex.  
Luz Marina TRUJILLO, Maria Auxiliadora CHAVES, Amélia Shioko AKATUKA & Maria Helena IHA ..... 91-96
- 858 Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* na Região de Campinas, SP  
— Occurrence of *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* in the area of Campinas, SP  
Sílvia Regina BARALDI, Eneida Gonçalves Lemes MARQUES & Rosa Maria Donini Souza DIAS ..... 97-103

## SURTO DE TOXINFECÇÃO ALIMENTAR CAUSADO PELA AÇÃO SIMULTÂNEA DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA E *SALMONELLA ENTERITIDIS*

### -ESTUDO DE CASO-

Ricardo Souza DIAS\*  
Luiz Simeão do CARMO\*  
Maria Crisolita Cabral da SILVA\*

RIALA 6/844

DIAS, R. S. E COL. — Surto de Toxinfecção Alimentar Causado pela Ação Simultânea de Enterotoxina Estafilocócica e *Salmonella Enteritidis* — Estudo de Caso. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 7-11, 1999.

**RESUMO:** Um surto de toxinfecção alimentar envolvendo dezesseis pessoas foi investigado em março de 1997 na cidade de Passos-MG. Quatorze (87,5%) foram acometidas com os seguintes sintomas: náuseas, vômitos, cefaléia, febre, dores abdominais e diarreia. De acordo com a investigação o alimento suspeito foi uma torta gelada, sem cobertura e sem recheio, servida como sobremesa. A análise do alimento revelou que o referido episódio foi causado pela ação simultânea de enterotoxina estafilocócica C, D e *Salmonella enteritidis*.

**DESCRIPTORIOS:** Toxinfecção alimentar, Toxina estafilocócica, *Salmonella enteritidis*

### INTRODUÇÃO

O alimento, quando processado a partir de matéria-prima de qualidade, manipulado e armazenado sob boas práticas de higiene, é fonte de saúde imprescindível ao ser humano. Seus benefícios porém, podem reverter-se em motivo de doença quando tais medidas não são consideradas, resultando assim, em enfermidades caracterizadas como infecções e intoxicações alimentares.

As doenças veiculadas por alimentos podem dar origem a um surto de intoxicação que, segundo BEAN & GRIFFIN (1990)<sup>1</sup> trata-se de um incidente no qual duas ou mais pessoas experimentam doença similar após ingerirem alimento comum e uma análise epidemiológica o aponta como o causador da enfermidade. Assim, cabe ao Serviço de Vigilância Sanitária através de um conjunto de ações dirigidas a defesa e a proteção da

saúde coletiva, identificar e controlar permanentemente os fatores de riscos à saúde individual e coletiva<sup>9</sup>.

Das enfermidades transmitidas por alimentos, as causadas por *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* são as que têm causado transtornos à população com elevada frequência. A contaminação por *Salmonella* sp se dá principalmente pela ingestão de alimentos de origem animal e água. Segundo D'AOUST (1991)<sup>5</sup> a secreção de mucina pela mucosa intestinal, a contínua escamação das células epiteliais do lúmen e a peristalse intestinal agem sinergicamente se opondo ao ataque do microrganismo na parede intestinal. Ao romper estas barreiras de proteção naturais do hospedeiro, o microrganismo é capaz de invadir o tecido epitelial do trato gastrintestinal e produzir toxina, iniciando assim um quadro de infecção. Os principais sintomas são mal-estar, cefaléia, vômito, náusea e diarreia seguida de desidratação; o período de incu-

\* Serviço de Microbiologia de Alimentos — Divisão de Bromatologia e Toxicologia — Fundação Ezequiel Dias — Rua Conde Pereira Carneiro, 80 — Gameleira — 30510-010 — Belo Horizonte/Minas Gerais — Email: funed@prodeinge.gov.br.



bação varia entre 6 e 72 horas<sup>2</sup>. A infecção é auto-limitante, podendo durar de 4 a 7 dias onde o paciente pode eliminar esta bactéria nas fezes após antibioticoterapia<sup>1</sup>. O *S. aureus* por sua vez, é responsável por um quadro de intoxicação resultante da ingestão de toxina pré-formada no alimento<sup>8</sup> sendo os produtos de confeitaria elaborados com cobertura e recheio os alimentos mais comuns na sua transmissão<sup>7</sup>; os principais sintomas são náusea, vômito, dores abdominais e diarreia que surgem entre 1 e 6 horas após a ingestão do alimento suspeito<sup>3</sup>.

Os microrganismos envolvidos em enfermidades transmitidas por alimentos são capazes de provocar uma série de sintomas que caracterizam a doença. Assim, o encaminhamento da ficha de inquérito se torna um importante subsídio para a análise laboratorial.

Este trabalho tem como objetivo relatar a ocorrência de um surto de toxinfecção alimentar causada pela ação simultânea de enterotoxina estafilocócica e *Salmonella enteritidis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Episódio

Em março de 1997, um surto de toxinfecção ocorrido na cidade de Passos-MG foi notificado ao Serviço de Vigilância Sanitária. Após a análise epidemiológica, uma torta gelada, sem cobertura e sem recheio foi indicada como alimento suspeito. O alimento foi produzido artesanalmente utilizando-se na sua elaboração, ovos, leite pasteurizado, coco ralado comercial, farinha de trigo, leite condensado, manteiga de leite e açúcar.

### 2.2 Exame Laboratorial

A amostra foi enviada ao Serviço de Microbiologia de Alimentos -DBT-IOM-FUNED- em embalagem plástica hermeticamente fechada, sob refrigeração, sendo prontamente analisada.

#### — Contagem de *Staphylococcus aureus*

Vinte e cinco gramas do alimento suspeito foram homogeneizados em 225 mL de água peptonada tamponada 0,1% (Stomacher 400). Em seguida, uma alíquota de 0,1mL foi plaqueada em superfície de agar Baird Parker, assim como as diluições decimais sucessivas. Em seguida, as placas foram incubadas por 48 horas a 37°C. Após este período, realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias suspeitas<sup>11</sup>.

#### — Detecção de enterotoxina estafilocócica no alimento

Utilizou-se o kit de ELISA (SET-EIA) baseado na técnica de ELISA sanduíche<sup>6</sup>. Colocou-se 20 mL do extrato do alimento suspeito em um erlenmeyer e adicio-

nou-se “tween 20” na concentração de 0,25% e soro normal de coelho numa concentração de 2,5%. Incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se quatro bolas de poliestireno sensibilizadas com anticorpos específicos (anti-A, anti-B, anti-C e anti-D). Como controle positivo utilizou-se extrato de alimento estéril contendo uma cepa de *S. aureus* F.R.I. 100, o qual acrescentou-se uma bola de poliestireno sensibilizada com anticorpo anti-A. Como controle negativo, adicionou-se à amostra suspeita uma bola sensibilizada com imunoglobulinas de soro normal de coelho. Todo o material ficou sob agitação (agitador Martínez-Taboada) a temperatura ambiente. Em seguida as bolas foram lavadas com uma solução de NaCl 0,14 M, “tween 20” 0,1% e transferidas para seus respectivos tubos onde adicionou-se o conjugado específico permanecendo por 6 horas a temperatura ambiente. Após este período, acrescentou-se 1 mL de p-nitrofenilfosfato em cada tubo. O desenvolvimento de uma cor amarela revelava a presença de enterotoxina.

#### — Pesquisa de *Salmonella* sp.

Para a pesquisa de *Salmonella* sp realizou-se a etapa de pré-enriquecimento homogeneizando 25 gramas do alimento suspeito em 225 mL de água peptonada tamponada 1% (Stomacher 400). Em seguida incubando por 18-24 horas a 37°C. Para a etapa de enriquecimento seletivo, uma alíquota de 1mL foi inoculada em caldo selenito-cistina (37°C-24h)<sup>11</sup> e como metodologia alternativa, utilizou-se uma alíquota de 0,1 mL inoculada em caldo Rappaport-Vassiliadis (43°C-24h)<sup>11</sup>. No isolamento diferencial, os caldos foram semeados por esgotamento em agar *Salmonella-Shigella* e agar para enterobactérias segundo Hektoen (37°C-24h). Em seguida, as colônias suspeitas foram inoculadas paralelamente em agar tríplice-açúcar-ferro e agar lisina-ferro (37°C-24h); às culturas positivas foram então submetidas às provas de aglutinação com soro polivalente “O” pela Divisão de Biologia Médica-IOM-FUNED e posteriormente encaminhadas ao Departamento de Bacteriologia -FIO-CRUZ- Rio de Janeiro para identificação.

## RESULTADOS

Segundo a ficha de inquérito, dezesseis pessoas, entre amigos e familiares, consumiram o alimento suspeito. Quatorze (87,5%) foram acometidas, das quais, 4 (25%) foram hospitalizadas apresentando sintomas severos. O tempo decorrido entre a ingestão do alimento e o aparecimento dos primeiros sintomas variou entre 4 e 8 horas (período de incubação). As manifestações generalizadas foram vômitos, náusea, dor de cabeça e febre e as

manifestações entéricas consistiam em dores abdominais e diarreia.

As análises realizadas revelaram a presença de enterotoxinas estafilocócicas C e D e contagem de *Sta-*

*phylococcus aureus* foi inferior a 100 Unidades Formadoras de Colônias por grama de alimento. As análises também revelaram a presença de *Salmonella enteritidis* em 25 gramas do alimento.

### INQUÉRITO INDIVIDUAL

ESTADO: \_\_\_\_\_  
 MUNICÍPIO: \_\_\_\_\_  
 SECRETARIA: \_\_\_\_\_

#### A- DADOS GERAIS

1-Nome completo: \_\_\_\_\_  
 2-Endereço: \_\_\_\_\_  
 3-Idade: \_\_\_\_\_  
 4-Sexo: \_\_\_\_\_

#### B- SINAIS, SINTOMAS CLÍNICOS E TRATAMENTO

7 - Apresentou sinais e ou sintomas: não \_\_\_ sim \_\_\_ náuseas \_\_\_ vômitos \_\_\_ cólicas \_\_\_ diarreia \_\_\_ febre \_\_\_ diarreia com sangue \_\_\_ distensão abdominal \_\_\_ dor de cabeça \_\_\_ outros \_\_\_\_\_  
 8 - Início dos sintomas: data \_\_\_\_\_  
 Hora início dos sintomas: \_\_\_\_\_;  
 9 - Recebeu tratamento: não \_\_\_ sim \_\_\_ Qual \_\_\_\_\_  
 10 - Necessitou internação hospitalar: não \_\_\_ sim \_\_\_ Onde \_\_\_\_\_  
 11 - Usou antibiótico: não \_\_\_ sim \_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

#### C- ALIMENTOS INGERIDOS

Refeição	12-alimentos ingeridos	13-hora da ingestão	local do consumo (nome e endereço)
do dia do início dos sintomas			
do dia anterior ao início dos sintomas			
de dois dias antes do início dos sintomas			

15-Período de incubação: \_\_\_\_\_

#### D-AMOSTRA PARA ANÁLISE LABORATORIAL

16-Tipo de amostra	17-Encaminhada	18-gentenológico	19-Contagem	20-Interpretação
___ fezes	___ sim ___ não			
___ vômito	___ sim ___ não			
___ sangue	___ sim ___ não			
___ ambiente	___ sim ___ não			
___ água	___ sim ___ não			
___ alimento	___ sim ___ não			

21-Data do inquérito: \_\_\_\_\_

## RELATÓRIO FINAL DE INVESTIGAÇÃO DE SURTO DE ENFERMIDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Secretaria de Saúde: \_\_\_\_\_  
 Município: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ Nome do estabelecimento/evento \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Bairro: \_\_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_ UF \_\_\_\_\_

comensais	Nº	%	sinais/ sintomas	Nº	%	faixa etária	Nº	%
entrevistados			náuseas					
doentes reais			vômito					
doentes estimados			cólica abdominal					
hospitalizados			distensão abdominal					
óbitos			diarréia					
			diarréia com sangue					
mediana em período de incubação			febre					
			dor de cabeça					

Local de preparo	Local de ingestão	Sexo	Nº	%
____ Residência	____ Residência	Masculino		
____ Comércio	____ Comércio			
____ Indústria	____ Indústria			
____ Escola, creche	____ Refeitório	Feminino		
____ Clubes	____ Clubes			
____ Hospital	____ Escola, creche			
Outros _____	____ Hospital			
	Outros _____			

### DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Para que um surto possa ser satisfatoriamente elucidado é necessário que o Serviço de Vigilância Sanitária investigue, através de formulários específicos, o episódio ocorrido. Para isto, é necessário que seja feita:

- notificação;
- verificação da concordância entre a notificação e a existência do possível surto;
- estabelecimento da existência do surto;
- relacionamento do surto ao tempo, lugar e pessoas envolvidas;
- formulação de hipóteses.

Após a análise dos dados levantados pelos agentes do Serviço de Vigilância Sanitária durante a investigação torna-se possível determinar os sintomas mais frequentes, as taxas de ataque e o período de incubação. Como estas informações são inerentes a cada patogenia, a análise dos dados são capazes de indicar o alimento suspeito e os possíveis agentes etiológicos.

A presença de *Samonella* no alimento sugeriu uma contaminação pós-processamento, possivelmente veiculada pelos utensílios, pois é sabido que a temperatura utilizada no preparo do bolo é suficiente para a eliminação

do microrganismo. Segundo NOLETO & BERGDOLL (1992)<sup>8</sup> contagem igual ou superior a 10<sup>5</sup> UFC de *S. aureus* por grama do alimento é quantidade suficiente para a produção de enterotoxina. Os resultados obtidos sugerem que o *S.aureus* esteve presente em algum ingrediente utilizado na elaboração do alimento e que o mesmo foi eliminado durante as etapas de processamento, permanecendo apenas as enterotoxinas. Segundo WENDPAP & ROSA (1993)<sup>12</sup> as toxinas podem manter-se ativas após a autoclavagem a 120°C por 15 minutos.

A investigação de um surto tem como finalidade identificar as pessoas acometidas e o risco de exposição, os fatores de risco e os pontos críticos de controle, os alimentos implicados, o agente etiológico, os fatores causais e o tipo de patogenia. Estas informações auxiliarão no tratamento das pessoas envolvidas como também na prevenção da ocorrência de novos episódios.

### AGRADECIMENTOS

Serviço de Microbiologia da Divisão de Biologia Médica - IOM-FUNED-Belo Horizonte-MG.

Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobactérias-Instituto Oswaldo Cruz- Rio de Janeiro-RJ.

DIAS, R.S. e col. — Outbreak of food toxical infection caused by simultaneous action of Staphylococcal enterotoxin and *Salmonella Enteritidis*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58(1): 7-11, 1999.

ABSTRACT : An outbreak involving sixteen people was investigated in march of 1997 in the city of Passos-MG-. Fourteen of them (87,5%) became ill with sickness, vomiting, dizziness, fever, abdominal pain and diarrhoea. According to the investigation the food involved was an iced pie served as dessert. The analysis showed that the food poisoning was due to the simultaneous presence of staphylococcal enterotoxins C, D and *Salmonella enteritidis*

DESCRIPTORS: Food poisoning, Staphylococcal enterotoxin, *Salmonella enteritidis*

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEAN, N. & GRIFFIN, P.N. Foodborne diseases outbreaks in the United States, 1973-1983: Patogens vehicles and trends. *JOURNAL FOOD PROTECTION*, v.53, n° 9, p.804-807, 1990.
2. BENENSON, A.S. ed. *El control de las enfermedades transmissibles in el hombre*. Washington D.C., Organización Panamericana de la Salud, 1992. p.458-463: Salmoneloses. (OSP-Publicación científica, 538)
3. BERGDOLL, M.S. Staphylococcal intoxications, In: REIMANN H., BRYAN, F.L. (eds.) *Foodborne infections and intoxications*. Academic Press, Inc., New York, 1979, p.443-494.
4. CENTERS OF DISEASE CONTROL. Questions and answers about *Salmonella enteritidis* and eggs. Atlanta, 7 de janeiro de 1994.
5. D'AUST, J. Y. Pathogenicity of Foodborne *Salmonella*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY*, v.12, n°17, p.40, 1991.
6. FEY, H., PFISTER, H., RUEGG, O. Comparative evaluation of different enzyme-linked immunosorbent assay systems for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* v.19, n°1, p. 34-38, 1984.
7. GENIGEORGES, C. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY*, v. 9, n° 4, p. 327-360, 1989.
8. NOLETO, A.L., BERGDOLL, M.S. Production of enterotoxin by a *Staphylococcus aureus* strain that produces three identifiable enterotoxins. *JOURNAL FOOD PROTECTION*, n° 45, p.1096-1097, 1982.
9. ROUQUAIROL, M.Z. *Epidemiologia e Saúde*, 4ª ed. MESDI, Rio de Janeiro, 1994, 540p.
10. SCHOTHORST, M.V., RENAULD, A.M. Dynamics of *Salmonella* isolation with modified Rappaport's medium (R10). *JOURNAL APPLIED BACTERIOLOGY*, v 54, n° 2, p. 209-215, 1983.
11. VANDERZANT, C. & SPLITTSOESSER, D.F. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3ª ed. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1992, 1100p.
12. WENDPAP, L.L. & ROSA, O.O. Presença de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas consumido no município de Cuiabá-MT. *HIGIENE ALIMENTAR*, v.27, p.23-29, 1993.

Recebido para publicação em 16/12/97

## SALMONELAS ISOLADAS DE QUEIJOS TIPO "COALHO": CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA E RESISTÊNCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS — RECIFE (PE)

Maria José de SENA \*  
Mônica M.O.P. CERQUEIRA \*\*  
Deise A. dos SANTOS \*\*\*  
Geraldo LEOCADIO FILHO \*\*\*\*  
Ricardo Souza DIAS\*\*\*\*\*

RIALA 6/845

SENA, M. J. e col. — Salmonelas Isoladas de Queijos Tipo "Coalho": Caracterização Sorológica e Resistência a Agentes Antimicrobianos — Recife (Pe). *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 58 (1): 13-17, 1999.

**RESUMO:** Com o objetivo de isolar, identificar e avaliar a resistência antimicrobiana de linhagens de *Salmonella*, 107 amostras de queijo tipo "coalho" foram colhidas no período de janeiro a maio de 1997, no comércio varejista de Recife (PE). As amostras, obtidas de estabelecimentos comerciais que acondicionavam o produto em temperatura ambiente, variando entre 29,0 e 33,0°C eram transportadas em embalagens plásticas hermeticamente fechadas, sob refrigeração por via aérea até Belo Horizonte (MG) onde eram prontamente analisadas pelo Serviço de Microbiologia de Alimentos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). O isolamento e identificação de *Salmonella* foram realizados segundo metodologia preconizada por VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992). Das amostras analisadas, 8,41% (9/107) apresentaram-se positivas para *Salmonella*. *Salmonella* I (O11:-:1,6; O18; 6,7:k:-; 3,10:y:-; 6,7:-:enz<sub>15</sub>; 13,23:z:-); *Salmonella* sp. *Salmonella enteritidis* foi identificada individualmente em 11,11% (1/9) das amostras. Apenas *Salmonella enterica* subsp I (6,7:-:enz<sub>15</sub>) apresentou frequência de 22,22% de positividade (2/9). As linhagens isoladas apresentaram resistência frente a 37,5% (6/16) dos produtos antimicrobianos testados: ampicilina, tetraciclina, cefotaxima, sulfametopina, trimetoprim e sulfazotrim. A sensibilidade foi observada em 62,5% (10/16), frente aos seguintes antimicrobianos: ciprofloxacina, tobramicina, ceftazidima, amoxicilina, polimixina B, gentamicina, cloranfenicol, amicacina, ofloxacina e cefoxitina.

**DESCRITORES:** Queijo Coalho, *Salmonella*, Antimicrobianos

### INTRODUÇÃO

De acordo com o Código de Defesa do Consumidor, é de responsabilidade do Serviço de Vigilância Epidemiológica, garantir, através de ações e atividades, a saúde e segurança da comunidade contra os riscos provocados por práticas no fornecimento de produtos e serviços considerados perigosos e nocivos.

Entre os derivados lácteos, vários relatos<sup>3,4,5</sup> têm comprovado o envolvimento de queijos nas enfermida-

des transmitidas por alimentos demonstrando a alta frequência de contaminação destes produtos por microrganismos patogênicos. Comumente, tem sido observada a contaminação por coliformes fecais, *Staphylococcus* sp, *Listeria* sp, *Proteus* sp e *Salmonella* sp.

A ocorrência de infecções causadas por *Salmonella* adaptadas a espécie humana está diretamente relacionada com a produção de alimentos de origem animal destinados ao consumo humano<sup>2</sup>. Em relação a contaminação de queijos por *Salmonella*, Papadopoulou et. al., (1993)<sup>8</sup>

\* Departamento de Medicina Veterinária — Universidade Federal Rural de Pernambuco

\*\* Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal — Universidade Federal de Minas Gerais

\*\*\* Estudante de Biologia — Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

\*\*\*\* Divisão de Biologia Médica — Fundação Ezequiel Dias

\*\*\*\*\* Serviço de Microbiologia de Alimentos — Divisão de Bromatologia e Toxicologia — Fundação Ezequiel Dias — Rua Conde Pereira Carneiro, 80 — Gameleira — 30510-010 — Belo Horizonte / Minas Gerais.

descreveram que a presença deste patógeno, um dos mais importantes agentes de toxinfecção alimentar associados a produtos lácteos, tem sido adequadamente investigado devido ao seu significado em saúde pública<sup>11</sup>.

*Salmonella* é usualmente encontrada no trato intestinal de animais domésticos e selvagens, especialmente aves e répteis. Os principais veículos de disseminação de *Salmonella* têm sido os alimentos e a água.

A criação intensiva de gado leiteiro e ou de corte tem como consequência o uso indiscriminado de substâncias antibióticas visando prevenir doenças causadas por bactérias e protozoários, melhorar a conversão alimentar e reduzir o custo com a alimentação<sup>1</sup>.

O uso indiscriminado de substâncias antibióticas associadas a não observância do período de carência das drogas utilizadas levam a uma seleção de cepas<sup>7,15</sup>. Esta resistência pode comprometer o efeito da antibioticoterapia utilizada em infecções humanas ou em animais causadas por estes microrganismos. Embora os dados na literatura brasileira<sup>4,9,10</sup> demonstrem a presença desse microrganismo em queijos fabricados artesanalmente, as citações referentes a sua frequência em queijos tipo "coalho" comercializados na região Nordeste do país, são escassas<sup>10</sup>. Adicionalmente o perfil de resistência dessas bactérias a drogas antimicrobianas de uso comum em medicina humana e veterinária, não tem sido investigado.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- Obtenção das amostras

As cepas de *Salmonella* testadas quanto a antibiótico-resistência foram isoladas de amostras de queijos tipo "coalho" colhidas no período de janeiro a maio de 1997, no comércio varejista de Recife (PE), em sete locais diferentes. As amostras foram obtidas de estabelecimentos comerciais que acondicionavam o produto em temperatura ambiente, variando entre 29,0 e 33,0°C e transportadas sob refrigeração em embalagens plásticas hermeticamente fechadas, por via aérea até Belo Horizonte (MG), onde foram prontamente analisadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

### 2.2- Isolamento e identificação de *Salmonella* sp.

A metodologia de análise empregada para o isolamento do microrganismo foi segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992)<sup>16</sup>. Na etapa de pré-enriquecimento, 25g do alimento foram pesadas e homogeneizadas em 225 mL de Água Peptonada Tamponada 1%. Posteriormente o material foi incubado por 18-24 horas a 37°C, sob condições de aerobiose. Uma alíquota de 0,1mL foi transferida para o caldo Selenito-Cistina e incubada a 37°C por 24h, para etapa de enriquecimento seletivo. Foi utilizada, ainda,

uma metodologia alternativa, onde 0,1mL do caldo pré-enriquecido foi inoculado em caldo Rappaport-Vassiliadis e incubado a 43°C por 24h, sob condições de aerobiose<sup>12</sup>. O isolamento diferencial foi efetuado semeando-se os caldos em ágar *Salmonella-Shigella* e ágar entérico Hektoen a 37°C por um período de 24h. As colônias suspeitas foram em seguida, inoculadas simultaneamente em ágar Tríplice açúcar ferro e ágar açúcar ferro a 37°C por 24h. As culturas positivas foram submetidas às provas de aglutinação com soro polivalente "O" na Divisão de Biologia Médica-IOM-FUNED, e posteriormente enviadas para o Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz- Rio de Janeiro, para identificação sorológica.

### 2.3- Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Simultaneamente as cepas de *Salmonella* foram testadas quanto a resistência a diferentes antibióticos de uso comum em medicina humana e veterinária. Os antibióticos usados no teste foram: Tetraciclina (10µg), Clo-ranfenicol (30µg), Trimetropim (5µg), Sulfazotrin (25µg), Ampicilina (10µg), Cefotaxima (30µg), Sulfametropina (25µg), Ciprofloxacina (50µg), Tobramicina (10µg), Ceftazidima (30µg), Amoxicilina (10µg), PolimixinaB (300UI), Gentamicina (10µg), Amicacina (30µg), Ofloxacina (5µg), Cefoxitina (30µg). A metodologia empregada foi a descrita pela Secretaria de Saúde do Distrito Federal, através da Portaria nº 04/94, sob a forma de Manual de Procedimentos para Padronização do Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos. A partir da cultura pura, 5 a 10 colônias foram selecionadas e inoculadas em caldo Müller-Hinton, e incubadas a 35°C até obter a turvação padrão 0,5 da escala de Mc Farland. Obtida a turvação, o inóculo foi semeado em placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton. Com o auxílio de "swabs", a cultura foi semeada em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton em três diferentes eixos afim de se obter um esfregaço uniforme. Em seguida, os discos de antibióticos foram plicados à superfície do ágar. As placas foram incubadas a 35°C por um tempo variável de 16 a 20 horas e após esse período, procedeu-se a leitura dos halos de inibição.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro mecanismo de proteção contra os distúrbios gastrintestinais causados por bactérias entéricas é exercido pela microbiota intestinal através da produção de uma série de substâncias antagonicas como ácidos graxos, enzimas, bacteriocinas, e substâncias antibióticas. Este fenômeno de proteção ecológica é conhecido como efeito barreira microbiológica (EMB). Segundo

Trabulsi (1991)<sup>14</sup>, o uso de antibióticos contra infecções intestinais leva ao desequilíbrio deste efeito com conseqüente surgimento de infecções secundárias.

A resistência adquirida pelos microrganismos é um fenômeno espontâneo, sendo os antimicrobianos apenas agentes seletores de amostras resistentes a estas drogas<sup>14</sup>. Segundo Tavares (1988)<sup>13</sup>, nas enterobactérias a resistência é transmitida principalmente por plasmídeos. As enterobactérias uma vez selecionados e ingeridas pelo homem através do alimento poderão não responder satisfatoriamente á antibioticoterapia.

No que se refere a *Salmonella*, a antibioticoterapia torna o paciente mais sensível aos microrganismos, levando a piora do quadro clínico e excreção deste patógeno por períodos mais longos.

Os resultados obtidos revelaram a presença de *Salmonella* sp em 8,41% das amostras analisadas (9/107). *Salmonella* I ( O11:-:1,6; O18; 6,7:k:-; 3,10:y:-; 6,7:-:enz<sub>15</sub>; 13,23:z:- ); *Salmonella* sp. *Salmonella enteritidis* foi identificada individualmente em 11,11% (1/9). Apenas a *Salmonella enterica* subsp I (6,7:-:enz<sub>15</sub>) apresentou frequência de 22,22% de positividade (2/9).

Das drogas antimicrobianas testadas, as cepas isoladas apresentaram resistência frente a 37,5% (6/16) dos antimicrobianos: Ampicilina, Tetraciclina, Cefotaxima, Sulfametropina, Trimetoprin, Sulfazotrim. A sensibilidade foi observada em 62,5% (10/16), frente aos seguintes antimicrobianos: Ciprofloxacina, Tobramicina, Ceftazidima, Amoxicilina, Polimixina B, Gentamicina, Cloranfenicol, Amicacina, Ofloxacina, Cefoxitina (Tabela 01).

TABELA 01

Modelo de resistência antimicrobiana de linhagens de *Salmonella* em queijos tipo “coalho” comercializados em Recife (PE)

Modelo de Resistência																
	CFO	TET	CLO	TRI	SUT	AMP	CTX	SFT	CIP	TOB	CAZ	AMOPOL	GEN	AMI	OFX	
<i>S. enterica</i> subsp.I:																
(11:-:1,6) (1)	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	
(O18) (1)	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
(6,7:k:-) (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
(3,10:y) (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
<i>Salmonella</i> sp (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
(6,7:-:enz <sub>15</sub> ) (2)	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
(13,23:z:-) (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
<i>S. Enteritidis</i> (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
<b>Total</b>	01	02	0	0	01	01	0	01	0	0	0	0	0	01	0	

Cefoxitina (CFO-30µg), Tetraciclina (TET-10µg), Cloranfenicol (CLO-30µg), Trimetopim (TRI-5µg), Sulfazotrin (SUT-25µg), Ampicilina (AMP-10µg), Cefotaxima (CTX-30µg), Sulfametropina( SFT-25µg), Ciprofloxacina (CIP-50µg), Tobramicina (TOB-10µg), Ceftazidima (CAZ-30µg), Amoxicilina (AMO-10µg), Polimixina B (POL-300UI), Gentamicina (GEN-10µg), Amicacina (AMI-30µg), Ofloxacina(OFX-5µg).

Segundo Diaz de Aguayo et al. (1992)<sup>6</sup>, a alta incidência de resistência a drogas pode ser atribuída a ampla utilização de antibióticos no tratamento da população humana e animal.

Os dados observados neste estudo são superiores aos detectados por Diaz de Aguayo et al (1992)<sup>6</sup> em produtos lácteos comercializados no México. Estes autores verificaram resistência múltipla de *Salmonella* contra diferentes antibióticos, sendo que 4% das amostras de leite pasteurizado apresentavam 100% de resistência a penicilina e alguma resistência a polimixina B e cloranfenicol. Embora estes autores não tenham pesquisado esta resistência em amostras de queijo, tais dados demonstram o risco potencial de veiculação destes microrganismos altamente resistentes a antimicrobianos. Este nível relativamente alto de cepas de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos representa um risco real de saúde pública. Esta resistência a drogas torna o controle de agentes infecciosos como a *Salmonella* mais difícil com drogas normalmente usadas no tratamento da doença.

Adicionalmente, deve-se ressaltar o risco potencial de ocorrência deste tipo de toxinfecção alimentar pelo consumo deste tipo de queijo tão produzido e consumi-

do na região Nordeste. Embora a possível causa da contaminação não tenha sido estabelecida, suspeita-se que o problema esteja relacionado a uma somatória de fatores que incluem: uso de leite cru proveniente ou não de vacas com mamite, ordenha em condições higiênico-sanitárias deficientes, manipulação e fabricação do queijo de forma precária e acondicionamento e comercialização em temperatura ambiente.

## CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho, pode se concluir que queijo tipo “coalho” produzido artesanalmente em Pernambuco e comercializado em Recife apresenta alto nível de contaminação por *Salmonella* e resistência a diferentes antimicrobianos, representando risco potencial a saúde pública.

## AGRADECIMENTOS

Fundação Ezequiel Dias — Minas Gerais  
Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz- Rio de Janeiro.

RIALA 6/845

SENA, M. J. et al. — *Salmonella* Isolated from “curd” of Cheese: serological characterization and resistance to antimicrobial agents — Recife (Pe). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 13-17, 1999.

**ABSTRACT:** One hundred and seven samples of white cheese collected from January to May 1997 in retail trade of Recife (PE) were examined for the presence of *Salmonella*. The isolated *Salmonella* were then checked for antibiotic sensibility. The samples collected, were stored for sale at room temperature varying from 29.0 to 33.0°C and sent to Belo Horizonte city (MG) in plastic container by air mail under refrigeration immediately submitted to microbiological analyses. The methodology used to identify *Salmonella* was according to VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992). *Salmonella* was detected in 8,41% (9/107) of the samples as following: *Salmonella* 1 (O11:-:1,6 ; O18 ; 6,7:k:- ; 3,10:y:- ; 6,7:-enz-15 ;13,23:z:-), *Salmonella* sp. *Salmonella enteritidis* was detected in 11.11% (1/9) of the samples and *Salmonella enterica* subspl (grupo13.23:z:-) in 22.22% (2/9). Resistance against Ampicilin, Tetracyclin Cephotaxin, Sulphametropin, Trimetoprine, Sulfazotrin was verified in 37.5% (6/16) of the strains tested. Sensitivity to Cyprofoxacine, Tobramicin, Ceftazidine, Amoxicilin, Polimixin B, Gentamicin, Clorafenicol, Amicacin, Ofloxacin, Cefoxitin was observed in 62.5% (10/16) of the strains tested.

**DESCRIPTORS:** white cheese, *Salmonella*, Antibiotic Sensibility

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENENSON, A S. Salmonellosis in: El Control de las Enfermedades Transmisibles en el Hombre Washington D. C: (OSP-Publicación Científica, 538), Organización Panamericana de la Salud, p. 458 – 63, 1992.
2. CALZADA, C.T., NEME, S.N., IRINO, K., KANO, E., DIAS, A.M.G., FERNANDEZ, S.A., VAZ, T.M.I., PESSOA, G.V.A., Sorotipos de *Salmonella* identificados no período de 1977-1982, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.44, n.1, p.1-8, 1984.



3. CARMO, L.S. & BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). *Revista de Microbiologia*, v.21, n.4, p.320 – 323. 1990.
4. CARMO, L.S. do.; VIEIRA, C.A.; REIS, D'ARC.P. dos. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* present in food implicated in food poisoning. *Revista de Microbiologia*, v.27, p.122-25, 1996.
5. CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; FONSECA, L.M. Surto epidêmico de toxinfecção alimentar envolvendo queijo tipo minas frescal em Pará de Minas. *Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia*, v.46, n.6, p.723-728. 1994.
6. DIAZ DE AGUAYO, M.E.; LEON DUARTE, A. B. & MONTES DE OCA CASTILHO. Incidence of multiple antibiotic resistant organisms isolated from retail milk products in Hemisillo, México. *Journal of Food protection*, v.55, n.5, p.370 – 373, 1992.
7. GUSTAFSON, R., H. Use of antibiotics in livestock and human health cancers. *Journal Dairy Science*, v.74, n.4, p.1428 – 1432, 1991.
8. PAPADOPOULOU, C.; MAIPA, V.; DIMITRIU, D.; PAPPAS, C.; VOUTSINAS, L. MALATOU, H. Behaviour of *Salmonella enteritidis* during the manufacture, ripening, and storage of feta cheese made from unpasteurized ewe's milk. *Journal of Food Protection*, v.56, n.1 p. 25-8, 1993.
9. SANTOS, E.C.; GENIGEORGIS, C. & FARVERT, T.B. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufactured Brazilian minas cheese. *Journal Food Protection*, v.44, n.3, p.177 – 178. 1981.
10. SANTOS, F.A.; NOGUEIRA, N. A.; & CUNHA, G.M.A. Aspectos microbiológicos do queijo tipo "coalho" comercializado em Fortaleza (CE). *Boletim do CEPPA*, v.13, n.1, p.31-36. 1995.
11. M.C.C.; CASTRO, D.G. Ocorrência de surto de toxinfecção alimentar causada por queijo tipo "Minas". in: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 13, 1995, Juiz de Fora (MG). ILCT, 1995, p.145 – 147.
12. SCHOTHORST, M.V. RENAUD, A M. Dynamics of *Salmonella* isolation with modified rappaport's medium (R10). *Journal of Applied Bacteriology*, v.54, n.2, p.209-215, 1983.
13. TAVARES, W. Resistência Bacteriana. *Manual de Antibiótico para Estudantes de Medicina*. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1988, p.81-98.
14. RABULSI, L.R. *MICROBIOLOGIA*, Rio de Janeiro. Livraria Atheneu Editora, 2ed. 1991. 386p.
15. VALQUEZ-MORENO, L. Antibiotic residues and drug resistant bacteria in beef and chicken tissues. *Journal Food Science*, v.55, n.3, p.632-634, 1990.
16. VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.T. *COMPENDIUM FOR THE MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS*, Washington. DC- American Public Health Association. 1992. 1219p.

Recebido para publicação em 22/12/97

## PUDINS DIETÉTICOS E CONVENCIONAIS: AVALIAÇÃO DAS INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS CONTIDAS EM SUAS ROTULAGENS.

Maria Lima GARBELOTTI \*  
Maria A. de Brito RODAS \*  
Sonia Tucunduva PHILIPPI \*\*  
Andrea Romero LATTERZA\*\*

RIALA 6/846

GARBELOTTI, M. L.; RODAS, M.A. de B.; PHILIPPI, S. T.; LATTERZA, A. R. — Pudins dietéticos e convencionais: Avaliação das informações nutricionais contidas em suas rotulagens. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1), 19-24, 1999.

**RESUMO:** Neste trabalho foram analisadas 7 amostras de pudins, sendo 5 produtos dietéticos e 2 produtos convencionais, de cinco marcas diferentes. Adquiridas em supermercados da Cidade de São Paulo, visando avaliar as informações nutricionais contidas em suas rotulagens. Os pudins foram preparados de acordo com a indicação dos fabricantes e padronizou-se para os dietéticos, o leite desnatado e, para os convencionais, o leite integral. A análise constou da determinação de lipídios, carboidratos, proteínas e do cálculo do valor calórico total. Utilizando-se metodologias descritas nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Nos alimentos dietéticos, duas amostras apresentaram valores calóricos bem diferentes dos declarados nos rótulos, onde as calorias se apresentaram, uma subestimada em 63,80% e outra superestimada em 35,93%. Nas demais amostras, inclusive dos produtos convencionais, os valores se encontraram com diferenças menores do que 10,00%. Com relação aos teores de lipídios, somente uma amostra (marca B — convencional) apresentou no rótulo teor concordante com o resultado experimental. Quanto aos teores de glicídios, exceto a amostra (marca B — dietético) que subestimou este valor em 27% no rótulo, todas as outras amostras indicavam nos rótulos, teores deste componente com diferenças abaixo de 10% dos resultados obtidos experimentalmente. Os produtos dietéticos analisados não atenderam aos padrões exigidos pela legislação em vigor. As informações nutricionais apresentadas nos rótulos e embalagens são deficientes e algumas vezes incorretas.

**DESCRITORES:** Pudins; pudins dietéticos e convencionais; informação nutricional em rótulos; Legislação.

### INTRODUÇÃO

A sociedade, atualmente, tem atribuído “status” à forma física e a preocupação com o peso corpóreo é constante entre adultos, adolescentes e até mesmo crianças<sup>9,15</sup>. Esta preocupação vem causar um ambiente propício ao comércio de alimentos dietéticos ou de “baixas calorias”<sup>9,14</sup>.

Com o aumento na procura destes alimentos, alguns consumidores mostram preferência por determinadas

marcas comerciais, no entanto poucos conhecem sobre a composição nutricional dos alimentos que consomem, lembrando que o conhecimento sobre a nutrição representa a chave para a saúde<sup>13</sup>.

Os pós para o preparo de pudins são constituídos basicamente de amido ou féculas pré-gelatinizadas<sup>12</sup>, com açúcar nos produtos convencionais e edulcorantes, dentro dos seus limites máximos permitidos, nos produtos dietéticos<sup>1</sup>.

Como os demais alimentos dietéticos, os pudins, deverão atender ao Regulamento Técnico de Alimentos

\* Seções de Laticínios, de Doces e de Amiláceos da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

\*\* Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública/USP.

para fins Especiais<sup>3,4,5</sup>, podendo-se utilizar, nas rotulagens, do termo "diet" para os alimentos com restrição de açúcar, ou para controle de peso e ou para dieta de ingestão controlada de açúcares<sup>5</sup>.

A importância em se colocar nas rotulagens dos alimentos informações relativas à composição nutricional, seus benefícios, os valores de referência de micro e macronutrientes em comparação com o número e tamanho de porções do alimento é uma prática adotada em muitos países, especialmente nos Estados Unidos<sup>15</sup>, e são apresentadas em alguns produtos alimentícios no Brasil.

Nos rótulos destes produtos, entre os outros dizeres, o da informação nutricional complementar poderá ser expressa por cem gramas do produto pronto para o consumo e em comparação com o conteúdo de nutrientes e valor energético, calculado a partir de versões diferentes do mesmo alimento ou alimento similar do mercado<sup>3,5</sup>.

O uso, como forma adicional, da informação nutricional expressa por porção do alimento, antes indicada pela Portaria SVS/MS nº 234/96<sup>1</sup> e, que a partir do dia 13/01/98 foi revogada pela Portaria SVS/MS nº 29/98<sup>5</sup>, pode ser muito útil como melhor forma de esclarecimento ao consumidor. Destacamos que atualmente, a rotulagem nutricional é regulamentada pela Portaria SVS/MS nº 41/98<sup>6</sup>, que deixa como opção do fabricante o uso da informação nutricional por porção do produto pronto para o consumo.

Muitas vezes, o conteúdo energético ou valor calórico dos alimentos são considerados desnecessários ou prejudiciais à saúde, o que não é verdadeiro, pois a deficiência de micro e macronutrientes no organismo do indivíduo, podem produzir graves danos à saúde<sup>8,9</sup>.

Os alimentos dietéticos de baixa caloria, ou com restrição de açúcar, são geralmente consumidos por pessoas diabéticas, obesas e pessoas que querem perder ou manter o peso, acreditando assim, que estarão consumindo uma menor quantidade de calorias em relação aos produtos convencionais.

Neste contexto, considerando o comércio de alimentos dietéticos e a expectativa dos consumidores fren-

te a estes produtos, este trabalho teve como objetivo averiguar a veracidade das informações nutricionais contidas nos rótulos, comparando-os com os convencionais similares e enquadramento na legislação vigente.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram adquiridas 7 amostras de pós para o preparo de pudins (5 dietéticos e 2 convencionais), de 5 diferentes marcas, em supermercados da cidade de São Paulo, em março de 1997. As amostras foram convenientemente numeradas e codificadas como marcas A, B, C, D e E, que representam o universo de marcas comerciais existentes no mercado.

**PREPARO DAS AMOSTRAS:** No preparo das amostras (segundo modo de preparo indicado pelos fabricantes), padronizou-se para os alimentos dietéticos, o uso do leite desnatado e para os alimentos convencionais, o leite integral, nas preparações. Foram controlados os pesos dos pós para o preparo de pudins e os volumes de leites utilizados, para posterior controle de porcionamento. Após o preparo e porcionamento, os pudins foram levados à geladeira. Quando retirados, passou-se por um multiprocessador (Kitchen Machine Arno) em velocidade mínima, para uma melhor homogeneização, evitando assim, a presença de possíveis grumos.

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL:** Nas amostras preparadas foram realizados exames físico-químicos que constaram das determinações de glicídios totais, avaliados em amido e protídios, utilizando-se de metodologias indicadas nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>11</sup> e para a determinação de lipídios, o Método de Weibull-Stoldt (hidrólise ácida).<sup>10</sup> O valor calórico total foi calculado utilizando-se os fatores clássicos de conversão de Atwater, ou seja, 4 para os glicídios e proteínas e 9 para os lipídios<sup>17</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 1

Distribuição das amostras de pós para o preparo de pudins por marca, tipo, sabor e peso.

Amostra N°	Marca Codificada	Tipo do Pudim	Sabor do Pudim	Peso Declarado no Rótulo (g)	Peso Encontrado (g)
1	A	dietético	caramelo	25,00	26,19
2	B	dietético	chocolate	56,00	60,57
3	C	dietético	caramelo	25,00	26,25
4	D	dietético	caramelo	25,00	26,99
5	E	dietético	caramelo	25,00	24,75
6	A	convencional	baunilha	85,00	88,25
7	B	convencional	chocolate	85,00	89,23

Na Tabela 1, pode-se observar que apenas duas das amostras de produtos dietéticos (marcas A e B) tiveram os respectivos produtos convencionais similares apresentados no mercado. Para as demais marcas (C, D, E) verificou-se a existência apenas de produtos dietéticos. A maioria dos produtos analisados apresentaram peso

(em gramas) maior do que o declarado no rótulo dos pós para o preparo de pudins, pelos fabricantes.

Os resultados para as composições nutricionais obtidas através dos exames físico-químicos dos pudins dietéticos e convencionais, em comparação com as informações nutricionais declaradas nas rotulagens pelos fabricantes dos produtos, podem ser observados na Tabela 2.

TABELA 2

Distribuição da composição nutricional das amostras de pudins analisadas e da composição nutricional declarada nos rótulos dos pudins.

Amostra N°	Marca Codificada	Lipídios (g/100g)		Protídios (g/100g)		Glicídios (g/100g)	
		CNR	CNE	CNR	CNE	CNR	CNE
1	A	0,60	0,42	3,30	4,39	9,40	8,47
2	B	—	0,28	3,40	4,37	16,20	11,77
3	C	—	0,27	3,22	4,16	8,11	7,35
4	D	0,14	0,24	3,58	3,98	8,39	8,09
5	E	2,59	0,12	2,77	4,03	6,98	6,27
6	A	2,55	3,43	3,10	3,19	18,00	17,17
7	B	3,50	3,58	3,20	3,58	17,40	16,49

CNR = Conteúdo Nutricional de Rotulagem (informações dos fabricantes).

CNE = Conteúdo Nutricional Experimental (exame físico-químico).

Na Tabela 2, observa-se que para a maioria das amostras, comparando-se o conteúdo nutricional experimental e o conteúdo nutricional declarado em rótulo, apresentaram-se diferenças significativas quanto aos teores de lipídios. Na amostra 1 (marca A) e amostra 4 (marca D) foram encontrados resultados para lipídios, respectivamente,

30,00% abaixo e 71,42% acima, do declarado em rótulo. Na amostra 2 (marca B), cujo rótulo não indicava teor para lipídios, obteve-se experimentalmente 0,28g/100g (correspondente a 2,52 kcal/100g) e para a amostra 3 (marca C), onde o rótulo trazia a chamada "isento de lipídios", obteve-se 0,27g/100g (correspondente a 2,43 kcal/100g). A

amostra 5 (marca E), indicava o teor de 2,59g/100g de lipídios no rótulo, sendo este valor bem mais alto do que o obtido pelo exame físico-químico (0,12g/100g). Na amostra 6 (marca A), o rótulo mencionava um teor de lipídios, 35% abaixo do encontrado experimentalmente. Quanto aos resultados experimentais de protídios, foi verificado que somente nos produtos dietéticos, foi encontrado teores acima de 10%, dos valores declarados nos rótulos. Ainda na Tabela 2, com relação aos teores de glicídios avaliados em amido, a maioria das amostras apresentaram uma diferença menor do que 10,00%, quando comparados aos teores indicados pelas rotulagens. A amostra 2 (marca B) apre-

sentou valor experimental para glicídios 27,35% mais baixo do que o informado em rótulo. Esta mesma amostra trazia em sua rotulagem os seguintes dizeres: "Diabéticos: adicionada de 4,13g de açúcar por 100g do produto"; como uma chamada para a atenção do consumidor.

A informação nutricional apresentada pelos rótulos e embalagens é muitas vezes complexa, dificultando para os consumidores a capacidade de entendimento e, se esta vier expressa de forma errônea e deficiente, poderá prejudicar o indivíduo que necessita destes alimentos em dietas específicas, com comprometimentos a sua saúde.

TABELA 3

Calorias dos pudins obtidas por porções do alimento

Amostra N <sup>o</sup>	Marca Codificada	Peso do Pudim Preparado(g)	N <sup>o</sup> de Porções declaradas no Rótulo	Peso do Pudim/ Porção*(g)	Calorias em Cada Porção** (kcal/100g)
1	A (Dietético)	410,56	4	102,64	57,68
2	B (Dietético)	487,20	***	—	—
3	C (Dietético)	466,59	6	77,77	37,34
4	D (Dietético)	470,67	6	78,45	39,53
5	E (Dietético)	475,32	6	79,22	33,51
6	A (Convencional)	517,43	4	129,36	145,65
7	B (Convencional)	519,84	***	—	—

\* Peso obtido experimentalmente.

\*\* Valores obtidos experimentalmente.

\*\*\* As amostras 2 e 7, de mesma marca, não apresentaram nos rótulos as quantidades de porções pré-estabelecidas.

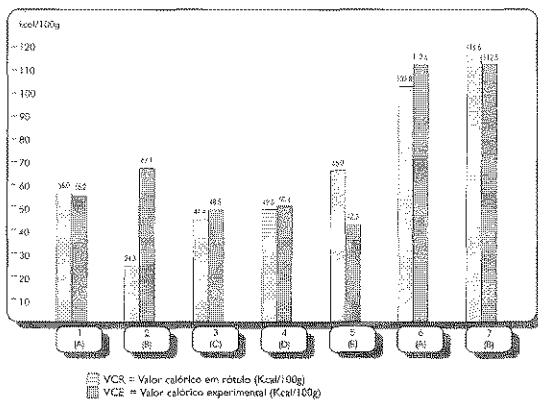


Figura 1 — Distribuição dos valores calóricos totais experimentais e os dos declarados nas rotulagens dos pós para o preparo de pudins (kcal/100gramas).

Na Tabela 3, encontram-se as quantidades das porções indicadas nos rótulos pelos fabricantes, os pesos dos pudins preparados e das porções obtidas com as suas respectivas calorias. Os porcionamentos dos pudins, dados em gramas de alimentos, e o quanto isto representa em termos de nutrientes e calorias, são necessários para que o consumidor avalie o quanto está consumindo em cada porção ingerida.

Os fabricantes dos alimentos dietéticos, mesmo declarando nas rotulagens a composição nutricional por cem gramas do produto pronto para o consumo, poderiam informar melhor os diferentes grupos populacionais, especialmente os diabéticos, os obesos e as pessoas que querem perder ou manter o peso, sobre o conteúdo

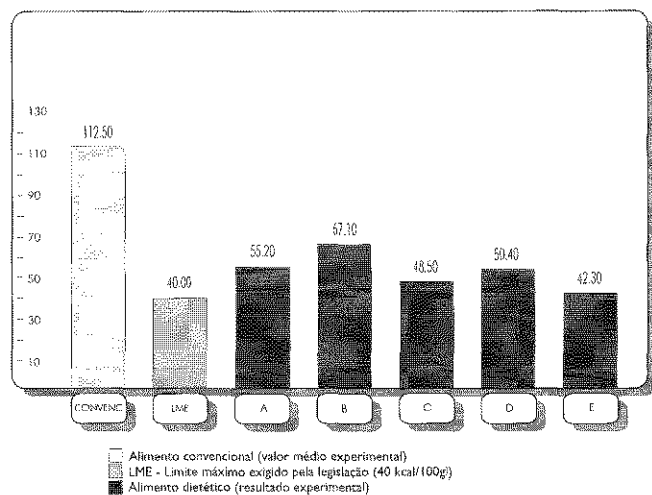


Figura 2 — Distribuição dos valores calóricos totais dos pudins dietéticos e média dos convencionais (kcal/100g), em relação à legislação<sup>31</sup>.

de nutrientes e valor energético dos alimentos, incluindo também os dados por porção consumida.

Na Figura 1, pode ser verificada a distribuição dos valores calóricos totais experimentais e os dos declarados em rótulos dos pudins (dietéticos e convencionais).

Com relação as amostras 2 (marca B) e 5 (marca E), ao compararmos os valores calóricos totais obtidos experimentalmente com os declarados nas rotulagens, verificou-se diferenças percentuais significativas, sendo que para a primeira, o valor foi subestimado em 63,80% e para a segunda, o valor foi superestimado em 35,93%.

Convém lembrar que a amostra 2 apresentava a mensagem “isento de lipídios” e a amostra 5 apresentava superestimção no teor de lipídios (2,59/100g). Nas demais amostras (marcas A, C e D) dos alimentos dietéticos e (marcas A, B) dos alimentos convencionais, os valores calóricos experimentais não diferenciaram em mais do que 10,00% dos valores calóricos informados nas rotulagens.

A distribuição dos valores calóricos totais das amostras de pudins dietéticos e a média dos convencionais, por marca e segundo a legislação vigente<sup>3</sup>, podem ser observados na Figura 2. Apesar dos alimentos dietéticos apresentarem diferença expressiva nos valores calóricos totais em relação aos alimentos convencionais similares, todas as amostras apontavam, indevidamente, a expressão “baixa caloria”, pois, como determina a legislação<sup>2,3</sup> o valor calórico não deve ultrapassar 40 kcal/100g. Os valores calóricos totais obtidos experimentalmente para os alimentos, nas marcas A, B, C, D e E representaram, respectivamente, 40,50%, 67,75%, 21,25%, 26,00% e 5,75% acima do limite máximo exigido pela legislação vigente.

## CONCLUSÕES

Os alimentos dietéticos, quando comparados com os seus convencionais similares, apresentaram uma diferença expressiva dos valores calóricos totais.

O uso da expressão “baixa caloria” para estes alimentos está inadequada, pois não atendem a legislação brasileira em vigor.

Algumas informações nutricionais descritas nas rotulagens dos produtos se apresentaram deficientes e incorretas.

Torna-se necessária uma fiscalização atenta e efetiva destes alimentos, para que além de se garantir uma boa qualidade, se enquadrem nas características básicas do tipo de alimento a que pertencem.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos as pesquisadoras Deise Aparecida Pinatti Marsiglia e Iracema Kimura de Albuquerque pelas informações técnicas prestadas e a colaboração de Cibele Dupont Rímoli e Ana Luíza Vilela Borges.

GARBELOTTI, M. L.; RODAS, M. A. de B.; PHILIPPI, S.T.; LATTERZA, A. R. Dietetic and conventional puddings: Evaluation of nutritional information that these labels contain. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58(1): 19-24, 1999.

**SUMMARY:** In this work 7 samples of puddings were analyzed, being 5 dietary products and 2 conventional products, of five different marks. Acquired in supermarkets of the City of São Paulo, seeking to evaluate the nutritional information contained in its labels. The puddings were prepared in agreement with the makers' indication and it was standardized for the dietary ones, the skimmed milk and, for the conventional ones, the integral milk. The analysis consisted of the determination lipids, carbohydrates, proteins and of the calculation of the total caloric value. Methodologies described in the Analytic norms of the Instituto Adolfo Lutz being used. In the dietetic foods, two samples presented caloric values very different from the declared in the labels, where the calories came, an underestimated in 63,80% and another overestimated in 35,93%. In the other samples, besides of the conventional products, the you are valued they found with smaller differences than 10,00%. With relationship to the lipids texts, only a sample (it marks B — conventional) it presented in the label text concordant with the experimental result. With relationship to the glucoside texts, except the sample (it marks B — dietary) that underestimated this value in 27% in the label, all the other samples indicated in the labels, texts of this component with differences below 10% of the obtained results experimentally. Os analyzed dietary products didn't assist to the patterns demanded by the legislation in vigor. The information nutricionais presented in the labels and packings are faulty and sometimes incorrect.

**DESCRIPTORS:** Puddings; dietetic and conventional puddings; nutritional information in labels.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 234 de 21 de maio de 1996, SVS/ Ministério da Saúde, Diário Oficial, Brasília, 27 mai. 1996, seq. 1, pt. 1, p. 9134-36.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 422 de 23 de agosto de 1996. SVS/ Ministério da Saúde, Diário Oficial, Brasília, 27 ago. 1996, seq. 1, p. 16520.
- BRASIL. Leis, Decretos, etc. — Portaria nº 27 de 13 de janeiro de 1998, SVS/ Ministério da Saúde, Diário Oficial, Brasília, 16 jan. 1998, sec. 1, 11:1-3.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 28 de 13 de janeiro de 1998, SVS/ Ministério da Saúde, Diário Oficial, Brasília, 15 jan. 1998, sec. 1, 10 E: 8.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 29 de 13 de janeiro de 1998, SVS/ Ministério da Saúde, Diário Oficial, Brasília, 15 jan. 1998, 10 E: 8-11.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 41 de janeiro de 1998, SVS/ Ministério da Saúde, Diário Oficial, 21 jan. 1998, seq. 1, 14-E, p. 4-5.
- DE ANGELIS, R. C. — Fisiologia da Nutrição: Fundamentos para nutrição e para desnutrição. São Paulo, EDART/ Ed., Universidade de São Paulo, 1977. V. 1, p. 44.
- DUARTE, A.L.N. Manuseio dos carboidratos na alimentação do diabético. *Rev. Higiene Alimentar*, 6 (23): 33-5, 1992.
- FUNDAÇÃO SIBAN (Simpósio Brasileiro de Alimentação e Nutrição). Dieta & Saúde: Implicações para a redução do risco de doenças crônicas. Açúcar e Alimentação, São Paulo, 6: 4, jan., 1990.
- FUNDAÇÃO DE ASSISTÊNCIA AO ESTUDANTE — FAE, MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO. Manual de Métodos Analíticos Oficiais de Controle de Qualidade. Brasília, MEC, p. 122, 1988.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. v. 1, 3ª ed., São Paulo, p. 42-44, 51, 1985.
- SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978. Diário Oficial, Brasília, 20 out. 1978, p. 32 — 3. Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas.
- RECEITA ROCHE. Nutrir significa apenas oferecer alimentos? *Rev. Higiene Alimentar*, 4 (2): 129-132, 1985.
- RODRIGUES, C. Mercado: Diet e Light. *Rev. Alimentos & Tecnologia*. IX(38): 55-8, 1995.
- PHILIPPI, S.T. et al. Avaliação sobre o valor nutritivo de alimentos infantis: logurtes, queijo "petit suisse" e bebida láctea. *Rev. Higiene Alimentar*. 9 (38): 22-6, 1995.

Recebido para publicação em 05/02/98

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DE COMPOSTOS DERIVADOS DO ÁCIDO ISONICOTÍNICO FRENTE AO *Mycobacterium tuberculosis*

Daisy Nakamura SATO\*  
Catarina Terezinha M. BACHA\*\*\*  
Daniel GARIBOTTI\*\*\*  
Marcelo BÖTTCHER\*\*\*  
Maria Clarice ERRERA\*  
Pablo PRESOTTO\*\*\*  
Carmo Elias Andrade MELLES\*\*

RIALA 6/847

SATO, D. N.; BACHA, C. T. M.; GARIBOTTI, D.; BÖTTCHER, M.; ERRERA, M.C.; PRESOTTO, P. & Carmo Elias Andrade MELLES, C. E. A. - Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de compostos derivados do Ácido Isonicotínico frente ao *Mycobacterium tuberculosis*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58 (1): 25-31, 1999.

RESUMO: O aumento significativo dos casos de tuberculose multidroga resistentes tem incentivado as pesquisas na busca de novas drogas e esquemas terapêuticos alternativos, que possam minimizar estes problemas. Compostos sintéticos derivados do ácido isonicotínico foram avaliados em relação a sua atividade *in vitro* frente a cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra – ATCC 25177, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) pela metodologia da macrodiluição em tubos. Todos os compostos estudados apresentaram atividade antibacteriana *in vitro*, com valores de CIMs que variaram de 0,062 a 0,250 µg/mL. Os valores de CBM foram, em geral, duas diluições mais altos do que os valores de CIM correspondentes. Os valores de CIMs e CBMs obtidos neste estudo estão próximos daqueles apresentados para a isoniazida, que consideramos como droga padrão.

DESCRITORES: *Mycobacterium tuberculosis*, Atividade antibacteriana, Perfil de sensibilidade, Concentração Inibitória Mínima.

## INTRODUÇÃO

A tuberculose pulmonar é uma doença que tem a sua magnitude ligada à situação socioeconômica da região ou do país<sup>18,30</sup>. Atualmente com o advento da AIDS, a coinfeção TB/HIV tem provocado um impacto na epidemiologia da tuberculose em todo o mundo, fato observado em países desenvolvidos e em desenvolvimento, principalmente nas Américas<sup>9,13,17,27,34</sup>.

A Organização Mundial da Saúde fez uma estimativa de 30.000.000 mortes por tuberculose nos próximos

dez anos e calcula que pelo menos 8.000.000 casos novos de tuberculose ocorreram no ano passado<sup>41</sup>.

No Brasil, apesar dos esforços do Programa de Controle Nacional da Tuberculose, onde até o ano de 1995, a cobertura vacinal em menores de 1 ano foi de 90% e a descoberta de casos novos atingiu 75% do esperado, os dados apontam para 90.000 casos novos e mais de 5.000 mortes por tuberculose, anuais<sup>7</sup>.

O diagnóstico definitivo da tuberculose pulmonar depende do isolamento e identificação do agente etiológico, o *Mycobacterium tuberculosis*, sendo que as medi-

\* Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto

\*\* Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central

\*\*\* Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul



das de controle, principalmente no que diz respeito à terapêutica, dependem dos resultados dos testes de sensibilidade aos quimioterápicos utilizados no tratamento. Dessa maneira, o laboratório tem um papel de extrema importância na quebra da cadeia de transmissão desse agente etiológico e para tal deve estar em constante parceria com o serviço de vigilância epidemiológica local<sup>35</sup>.

O tratamento da tuberculose passou por várias fases até o advento dos novos quimioterápicos utilizados nos esquemas terapêuticos atuais; chamamos a atenção para a era dos sanatórios, onde o "isolamento sanatorial" e o "regime higiênico terapêutico" eram considerados fundamentais para o êxito da cura da tuberculose<sup>28</sup>.

Desde o aparecimento de drogas que atuam no tratamento da tuberculose como a estreptomina, descoberta em 1944 e a isoniazida descrita em 1912 porém reconhecida como eficaz contra o *Mycobacterium tuberculosis* somente em 1952, a quimioterapia da tuberculose tem sido modificada no sentido de se buscar a cura para a doença e dessa maneira diminuir as taxas de incidência e mortalidade<sup>28</sup>. A partir da década de 60 com a introdução da rifampicina no esquema terapêutico o sucesso do tratamento tem sido garantido com a utilização do chamado esquema de curta duração, que consiste na associação da isoniazida, pirazinamida e rifampicina<sup>19,36</sup>.

Apesar da utilização de esquemas terapêuticos eficazes, nos últimos anos têm-se observado, em nível mundial, um aumento na incidência de tuberculose causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* resistente às principais drogas, o que reflete em uma falha dos programas de controle da tuberculose<sup>26,43</sup>. Mesmo onde o programa de controle da tuberculose é eficiente, como é o caso da cidade de São Francisco, Estados Unidos, tem havido um grande aumento dos casos em que o *Mycobacterium tuberculosis* apresenta resistência às drogas<sup>6</sup>.

Dessa maneira, vários inquéritos epidemiológicos têm sido realizados no sentido de se traçar um perfil de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* que vem circulando na população mundial<sup>5,10,12,14,16,20,23,25,39</sup>. No Brasil, vários inquéritos foram realizados porém de maneira esporádica e regionalizada<sup>3,4,31,33</sup>.

O constante aumento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à diferentes drogas, tem chamado a atenção dos pesquisadores para o desenvolvimento e a pesquisa de novos agentes antibacterianos quer sejam sintéticos ou naturais<sup>41</sup>.

Compostos sintéticos, formulados a partir de quimioterápicos utilizados no esquema terapêutico convencional da tuberculose, estão sendo testados quanto à sua atividade antibacteriana. YAMAMOTO et al.<sup>42</sup> testando 39 compostos derivados da pirazinamida, detectaram que 4 deles apresentavam atividades bacteriostática e bactericida contra 03 espécies de micobactérias de cres-

cimento lento, o *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* e o *Mycobacterium tuberculosis*.

Entre os compostos sintéticos derivados do ácido isonicotínico, a etionamida apresenta uma grande atividade frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, e hoje já se encontra incorporada ao Esquema III de tratamento da tuberculose<sup>24,29</sup>. Outros derivados do ácido isonicotínico como o isonicotinoil e a cianoacetil hidrazona, demonstraram resultados satisfatórios quanto à atividade *in vitro* e *in vivo* frente ao *Mycobacterium tuberculosis*<sup>41</sup>. Já os derivados halogenados de isoniazida não mostraram atividade antimicrobiana, quando testados frente a micobactérias e fungos<sup>38</sup>.

Recentemente, um grupo de pesquisadores do Departamento de Produção de Matéria Prima, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sintetizaram 36 novos compostos derivados do ácido nicotínico e isonicotínico. Este compostos foram testados quanto à atividade antimicrobiana *in vitro* frente à cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, sendo que 04 deles apresentaram bons resultados<sup>12</sup>.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de compostos derivados do ácido isonicotínico frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

## MATERIAL E MÉTODOS

**Compostos:** Os compostos derivados do ácido isonicotínico, arilideno isonicotinil hidrazidas (tabela I), foram sintetizados no Departamento de Produção de Matéria Prima, da Faculdade da Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e nos foi fornecido gentilmente pela Dra. Catarina Terezinha M. Bacha, professora titular do referido Departamento.

**Cepa de micobactéria:** A cepa de micobactéria utilizada neste estudo foi a cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra – ATCC 25177.

**Concentração Inibitória Mínima:** Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos derivados do ácido isonicotínico e da isoniazida, considerada como droga padrão, frente à cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra - ATCC 25177 utilizou-se a técnica proposta por ERICSSON & SHERIS<sup>15</sup>, adaptada para realização em meio líquido Middlebrook 7H9 (DIFCO), que denominaremos a seguir, meio 7H9. Os compostos derivados do ácido isonicotínico e a isoniazida foram diluídos em meio 7H9 para se obter a concentração final de 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 µg/mL. Foi adicionado a cada

tubo contendo as diferentes concentrações de compostos derivados do ácido isonicotínico e da isoniazida, 50 µL de uma suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, previamente incubado a 37°C durante 10 dias, com a turvação ajustada para a escala McFarland nº 1. Foi preparado um tubo controle positivo, inoculando-se 50 µL da suspensão bacteriana preparada como descrito acima, em 2,0 mL de meio 7H9. Os tubos assim preparados foram mantidos em estufa a 37°C e a leitura da CIM realizada após 10 dias de incubação. A CIM foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir macroscopicamente o crescimento das micobactérias, ou seja a CIM é definida pela diluição que não apresenta turvação visível a olho nu.

**Concentração Bactericida Mínima:** A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada através do método proposto por HAWKINS et al.<sup>21</sup>. Esta técnica consiste no subcultivo em meio sólido das diluições iguais e/ou superiores à CIM determinada. Para tal semeou-se 100 µL dessas diferentes diluições em meio de Lowenstein-Jensen. Em paralelo, realizou-se um controle semeando-se 100 µL do tubo controle positivo em meio de Lowenstein-Jensen. Todas as preparações foram incubadas por 28 dias a 37°C, para posterior leitura. A CBM é definida como a menor concentração da droga capaz de inibir mais do que 99,9% da população bacteriana no meio de cultura.

TABELA 1

Estrutura química dos compostos derivados do ácido isonicotínico.  
Arilideno-isonicotinil hidrazidas:



IDENTIFICAÇÃO	SUBSTITUINTES(W)	DENOMINAÇÃO
1	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Piperilideno
2	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O-NO <sub>2</sub>	5-nitro-2furfurilideno
3	2,5-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OCH <sub>3</sub>	2,5-dimetoxibenzilideno
4	p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -NO <sub>2</sub>	p-nitrobenzilideno
5	m-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -NO <sub>2</sub>	m-nitrobenzilideno
6	p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OH	p-hidroxibenzilideno
7	p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CN	p-cianobenzilideno
8	C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> O	2-furfurilideno
9	p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -F	p-fluorbenzilideno
10	p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CF <sub>3</sub>	p-trifluormetilbenzilideno
11	3,4-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OCH <sub>3</sub>	3,4-dimetoxibenzilideno
12	p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OCH <sub>3</sub>	p-metoxibenzilideno

## RESULTADOS

Os resultados das CIMs e CBMs dos compostos derivados do ácido isonicotínico e isoniazida, frente a cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, estão descritos na tabela 2.

A tabela 2, demonstra ainda os valores da relação CIM/CBM da isoniazida e dos compostos testados, onde podemos fazer uma avaliação de atividade bactericida ou bacteriostática dos referidos compostos.

TABELA 2

Determinação da CIM, CBM e relação CIM/CBM para isoniazida e os doze compostos derivados do ácido isonicotínico frente a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

COMPOSTOS TESTADOS	CIM $\mu\text{g/mL}$	CBM $\mu\text{g/mL}$	CIM/CBM
INH	0,062	2,0	0,031
1	0,125	2,0	0,062
2	0,062	1,0	0,062
3	0,125	2,0	0,062
4	0,125	2,0	0,062
5	0,250	2,0	0,125
6	0,062	0,25	0,248
7	0,250	2,0	0,125
8	0,125	2,0	0,062
9	0,125	2,0	0,062
10	0,250	2,0	0,125
11	0,125	2,0	0,062
12	0,125	2,0	0,062

## DISCUSSÃO

Considerando a problemática da resistência do *Mycobacterium tuberculosis* aos diferentes quimioterápicos<sup>12</sup>, várias têm sido as tentativas no sentido de encontrar alternativas para o tratamento da tuberculose pulmonar.

A determinação da atividade *in vitro* de novos quimioterápicos em conjunto com dados de farmacocinética da droga propiciam o desenvolvimento de esquemas terapêuticos alternativos a serem avaliados em ensaios clínicos clássicos<sup>8</sup>.

A isoniazida, hidrazida do ácido isonicotínico, foi sintetizada no início deste século, porém como já foi dito anteriormente, somente foi introduzida como medicação contra tuberculose por volta de 1950<sup>39</sup>. CHAKRAVARTY et al.<sup>11</sup> realizando modificações na estrutura química da hidrazida do ácido nicotínico, demonstraram que compostos com substituintes (W) dos grupos p-dimetilamino e p-hidroxi apresentaram atividade antibacteriana semelhante à isoniazida. Entretanto, os compostos sintetizados foram diluídos em meio de

Lowenstein-Jensen antes de sofrer a coagulação a 85°C. Dessa maneira, fica difícil ter um controle sobre a real manutenção da atividade antibacteriana do composto testado, devido ao aquecimento do meio por 50 minutos. Após a coagulação do meio e adição do inóculo de *Mycobacterium tuberculosis* os frascos vão para a estufa a 37°C por pelo menos 28 dias, quando também pode haver perda da atividade antibacteriana. Já VOYATZAKIS et al.<sup>40</sup> sintetizando compostos isonicotinoil hidrazonas e adicionando ions cobre e cobalto, verificaram um aumento na atividade antibacteriana destes compostos quando testados frente a uma cepa de *Mycobacterium tuberculosis* resistente à isoniazida. Verificaram entretanto, que os resultados de inibição antibacteriana foram independentes da concentração do composto isonicotinoil, porém dependentes da presença do ion cobre, onde a formação de quelatos talvez propiciassem a inibição do crescimento bacteriano.

O valor da determinação da CIM *in vitro*, incorporando os compostos a serem testados em meios sólidos, sejam à base de ovo, como o Lowenstein-Jensen ou

Ogawa ou à base de agar como o Middlebrook 7H10 (Difco) já foi muito discutido, pois além de serem métodos mais demorados e trabalhosos, podem comprometer a estabilidade dos compostos a serem testados, principalmente pelo longo período de incubação<sup>22,32</sup>.

Para a determinação da CIM de novos quimioterápicos, o meio de cultura líquido tem sido muito utilizado, seja pelo método convencional da macrodiluição em tubos ou pelo radiométrico (BACTEC). Este meio além de fornecer resultados mais rápidos, promove uma interação maior entre droga-bactéria, uma vez que a população bacteriana fica submergida no meio de cultura contendo a droga a ser testada. Diferente do meio sólido, onde a bactéria cresce na superfície do meio e o gradiente de concentração da droga pode sofrer variações quando incorporada ao meio. Pode-se contar ainda com as alterações provocadas pelo período de incubação e crescimento da bactéria<sup>32</sup>.

Avaliando os resultados da atividade antibacteriana dos doze compostos derivados do ácido isonicotínico frente à cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, pudemos observar que estes, pouco diferem do valor da CIM apresentada pela isoniazida, que consideramos como droga padrão. É interessante notar que pelo menos dois compostos, aqueles que têm como substituinte (W) o 5-nitro-2-furfurilideno e o p-hidroxibenzilideno, identificados como compostos 2 e 6 (tabela 2), respectivamente, revelaram o mesmo valor de CIM que a isoniazida (0,062 µg/mL). Dados de literatura demonstram que os valores de CIM para isoniazida frente ao

*Mycobacterium tuberculosis* variam de 0,02 a 0,05 µg/mL<sup>29,37</sup>, em experimentos que utilizaram também diluições da isoniazida em meio líquido, resultados estes que estão próximos dos identificados neste trabalho.

Em relação aos resultados de CBM de nosso experimento, pudemos observar que para a maioria dos compostos derivados do ácido isonicotínico obtivemos o valor de 2,0 µg/mL (tabela 2). Este resultado se analisado isoladamente pode não ter grande significado, mas se comparado com o cálculo da proporção CIM/CBM, expressa a potência bactericida das drogas testadas<sup>22</sup>. Os baixos valores obtidos pela relação CIM/CBM (tabela 2) sugerem que os compostos derivados do ácido isonicotínico apresentam alta atividade bactericida, à semelhança do que ocorre com a isoniazida, largamente estudada quanto à sua atividade bactericida<sup>29</sup>. Chamamos a atenção para o composto derivado do ácido isonicotínico que tem como substituinte o p-hidroxibenzilideno (nº 6) teve o valor de CIM igual ao da isoniazida, revelando na relação CIM/CBM um valor mais alto, ( 0,248 ) o que sugere ter boa atividade bacteriostática.

A partir dos resultados de CIM dos compostos derivados do ácido isonicotínico obtidos, nossos estudos vão continuar no sentido de se avaliar a toxicidade, parâmetros farmacocinéticos, biodisponibilidade, e interação com outras drogas. Devemos prosseguir ainda os estudos em relação à atividade antibacteriana intracelular destes compostos, utilizando para isto culturas de células, em especial, os macrófagos.

RIALA 6/847

SATO, D. N.; BACHA, C. T. M.; GARIBOTT, D.; BÖTTCHER, M.; ERRERA, M.C.; PRESOTTO, P. & Carmo Elias Andrade MELLES, C. E. A. - Minimal Inhibitory Concentration and Minimal Bactericidal Concentration determination of isonicotinic acid derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58(1): 25-31, 1999.

**ABSTRACT:** Tuberculosis still remains as a worldwide Public Health problem with high morbidity and mortality in developing countries. The increase of strains of *Mycobacterium tuberculosis* that are resistant to antimycobacterial agents is a worldwide problem. Consequently, it is urgently necessary to develop antimycobacterial drugs which are more effective than those used in conventional treatment of tuberculosis. Twelve isonicotinic acid derivatives were evaluated for *in vitro* activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra – ATCC 25177. The MIC and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra was determined by broth macrodilution method. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of all derivatives showed a range of 0,062 to 0,250 µg/mL. In general, the MBC values for all derivatives were two-fold higher than their corresponding MICs values. These MICs and MBCs values are close to isoniazid, that was considered the gold standard in this study.

**DESCRIPTORS:** *Mycobacterium tuberculosis*, Antimycobacterial activity, Susceptibility test, Alamar Blue.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BACHA, C.T.M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; BOTTCHER, M.; GARAKE, J.E.; GARIBOTTI, D.P. e PRESOTTO, P. Síntese de novos compostos com potencial atividade antibacteriana e antifúngica derivados do ácido isonicotínico. In: 49 a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, Belo Horizonte, 1997. Programas e Resumos. Belo Horizonte, Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1997a.
2. BACHA, C.T.M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; BOTTCHER, M.; GARAKE, J.E.; PRESOTTO, P. e GARIBOTTI, D.P. Síntese de novos compostos com potencial atividade antibacteriana e antifúngica derivados do ácido nicotínico. In: 49 a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, Belo Horizonte, 1997. Programas e Resumos. Belo Horizonte, Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1997b.
3. BARRETO, A.M.W. e MARTINS, F.M. Estudo da resistência primária no Brasil no período de 1986 a 1988. *Bol. Campanha Nac. Contra a Tuberc.*, 2: 21-5, 1988.
4. BEZEM, L.S.; VIEIRA, L.M.T.; ABRAHÃO, J.S.; GOMES, C. e ANDRADE, A.J.S. Resistência primária aos tuberculostáticos no Estado de Santa Catarina. *Bol. Campanha Nac. Contra a Tuberc.*, 2: 34-44, 1988.
5. BLOCH, A.B.; CAUTHEN, G.M.; ONORATO, I.M.; DANBURY, K.G.; KELLY, G.D.; DRIVER, C.R. and SNIDER Jr, D.E. Nationwide survey of drug-resistant tuberculosis in the United States. *JAMA*, 271: 665-71, 1994.
6. BRADFORD, W.Z.; MARTIN, J.N.; REINGOLD, A.L.; SCHECTER, G.F.; HOPEWELL, P.C. and SMALL, P.M. The changing epidemiology acquired drug-resistant tuberculosis in San Francisco, USA, *Tubercle*, 348: 928-31, 1996.
7. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Pneumologia Sanitária. Manual de Normas para o controle da tuberculose. Série A: Normas e Manuais Técnicos, 13, Brasília, 1995.
8. BURMAN, W.J. The value of in vitro drug activity and pharmacokinetics in predicting the effectiveness of antimycobacterial therapy: a critical review. *Am. J. Med. Sci.*, 313: 355-63, 1997.
9. CANTWELL, M.F.; SNIDER JR, D.E.; CAUTHEN, G.M. and ONORATO, I.M. Epidemiology of Tuberculosis in the United States, 1985 through 1992. *JAMA*, 272: 535-9, 1994.
10. CARPELS, G.; FISSETTE, K.; LIMBANA, V.; VAN DEUN, A.; VANDENBULCKE, W., PORTAELS, F. Drug resistant tuberculosis in sub-Saharan Africa: an estimation of incidence and cost for the year 2000. *Tuber. Lung. Dis.*, 76: 480-6, 1995.
11. CHAKRAVARTY, D.; BOSE, A. and BOSE, S. Synthesis and antitubercular activity of isonicotinoyl and cyanoacetyl hydrazones. *J. Pharmac. Sci.*, 53: 1036-9, 1963.
12. COHN, D.L.; BUSTREO, F. and RAVIGLIONE, M.C. Drug-Resistant Tuberculosis: Review of de Worldwide Situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. *Clin. Infec. Dis.* 24( suppl 1): S121-30, 1997.
13. DROBNIIEWSKI, F.; TAYLER, E.; IGNATENKO, N.; PAUL, J.L. NYE, P.; LYAGOSHINA, T. and BESSE, C. Tuberculosis in Siberia: I. An epidemiological and microbiological assessment. *Tuber. Lung Dis.*, 77: 199-206, 1996.
14. EL BAGHDADI, J.; LAZRAQ, R.; IBRAHIMY, S.; BOUAYAD, Z.; GUINET, R. and BENSLIMANE, A. Survey of primary drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Casablanca, Morocco. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 1: 309-13, 1997.
15. ERICSSON, H.M. and SHERIS, J.C. Antibiotic sensitivity testing: report for an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*, [B] Suppl 217: 3-90, 1971.
16. FRIEDEN, T.R.; SHERMAN, L.F.; MAX, K.L.; FUJIWARA, P.I.; CRAWFORD, J.T.; NIVIN, B.; SHARP, V.; HEWLETT Jr, D.; BRUDNEY, K.; ALLAND, D. and KREISWORTH, B.N. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes. *JAMA*, 276: 1229-35, 1996.
17. GARCIA, M.L.G.; GÓMEZ, J.L.V.; SANCHO, M.C.G.; ÁLVAREZ, R.A.S.; ZACARIAS, F. y AMOR, J.S. Epidemiologia del SIDA y la tuberculosis. *Bol. Oficina Sanit. Panam*, 116: 546-64, 1994.
18. GERHARDT FO., G. e HIJJAR, M.A. Aspectos epidemiológicos da tuberculose no Brasil. *J. Pneumol.*, 19: 4-10, 1993.
19. GRASSI, C. and PEONA, V. New drug for tuberculosis. *Eur. Resp. J.*, Suppl. 20P: 714s-8s, 1995.
20. GRUPO DE ESTUDIO DE TUBERCULOSIS RESISTENTE DE MADRID, Estudio transversal multihospitalario de tuberculosis y resis-

- cias em Madrid (Octubre de 1993-Abril de 1994), Med. Clin.(Barc), 106: 1-6, 1996.
21. HAWKINS, J.E.; WALACE Jr, R.J. and BROWN, B.A. Antibacterial susceptibility test: Mycobacteria. In: Balows, A. (ed.) Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C., 5th Ed., 1991, p. 1138-1152.
  22. HEIFETS, L. Qualitative and quantitative drug-susceptibility tests in Mycobacteriology. Am. Rev. Resp. Dis., 137: 1217-22, 1988.
  23. HOFFNER, S.E. Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*; some data from Sweden, Estonia na Ethiopia. Scand. J. Infect. Dis. Suppl., 98: 17-8, 1995.
  24. HOK, T.T. A comparative study of the susceptibility to ethionamide, thiosemicarbazone, and isoniazid of tubercle bacilli from patients never treated with ethionamide or thiosemicarbazone. Am. Rev. Resp. Dis., 90: 468-9, 1964.
  25. KIM, S.J.; BAI, G.H. and HONG, Y.P. Drug-resistant tuberculosis in Korea, 1994. Int. J. Tuberc. Lung Dis., 1: 302-8, 1997.
  26. KOCHI, A.; VARELDZIS, B.; STYBLO, K. Multidrug-resistant tuberculosis and its control. Rev. Microbiol., 144: 104-10, 1993.
  27. McMACKEN, M. y CASTRO, K.G. La tuberculosis y el virus de la inmunodeficiencia humana en los Estados Unidos, 1985-1992, Bol. Oficina Sanit. Panam., 117: 77-83, 1994.
  28. MELO, F.A.F. e AFIUNE, J.B. Quimioterapia da tuberculose: bases, condutas e procedimentos. J. Pneumol., 19: 42-9, 1993
  29. MUSSER, J.M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. Clin. Microbiol. Rev., 8: 496-514, 1995.
  30. RAVIGLIONE, M.C.; DYE, C.; SCHMIDT, S.; KOCHI, A. & The WHO Global Surveillance and Monitoring Project. Assessment of worldwide tuberculosis control. Lancet, 350: 624-9, 1997.
  31. SALEM, J.I.; GOH, K.S.; LITAIFF, L.R.L.; CARCLOSO, M.S.L. e BRIGLIA, M.F.S. An investigation of primary and acquired drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Manaus (Amazonas, Brazil). J. Pneumol., 16: 6-8, 1990.
  32. SIDDIQI, S.H.; HEIFETS, L.B.; CYNAMON, M.H.; HOOPER, N.M.; LAZLO, A.; LIBONATI, J.P.; LINDHOLM-LEVY, P.J. & PEARSON, N. Rapid broth macrodilution method for determination of MICs for *Mycobacterium avium* isolates. J. Clin. Microbiol., 31: 2332-8, 1993.
  33. SILVA, E.A.M.; SATO, D.N.; TELLES, M.A.S.; MARTINS, M.C.; PALACI, M. e UEKI, S.Y.M. Perfil de Resistência de *Mycobacterium tuberculosis* no Estado de São Paulo, 1986 a 1990. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 52: 37-40, 1992.
  34. SNIDER, D.E.Jr.; RAVIGLIONE, M. and KOCHI, A. Global burden of tuberculosis. In: Bloom, B.R. (ed.) Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1st Ed., 1994, p. 3-11
  35. TENOVER, F.C.; CRAWFORD, J.T., HUEBNER, R.E.; GEITER, L.J.; HORSBURGH Jr, C.R. and GOOD, R.C. The resurgence of Tuberculosis: Is your laboratory ready? J. Cl. Microbiol., 31: 767-70, 1993.
  36. TOMAN, K. Tuberculosis: case-finding and chemotherapy. Questions and answers. World Health Organization, 1979.
  37. TSUKAMURA, M. In vitro bacteriostatic and bactericidal activity of isoniazid on the *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex. Tubercle, 71:199-204, 1990.
  38. VIGORITA, M.G.; BASILE, M.; ZAPPALÀ, C.; GABRIELLI, G. and PIZZIMENTI, F. Halogenated isoniazid derivatives as possible antitubercular and anticneoplastic agents. Note 1. Il Farmaco, 47: 893-903, 1992.
  39. VISKUM, K. and JOK-JENSEN, A. Multidrug-resistant tuberculosis in Denmark 1993-1995. Int. J. Tuberc. Lung. Dis., 1: 299-301., 1997.
  40. VOYATZAKIS, V.A.E.; VASILIKIOTIS, G.S.; KARAGEORGIU, G. & KASSAPOGLOU, I.R. Influence of metallic ions on the antituberculous activity of isonicotinoyl hydrazones. J. Pharm. Sci., 57: 1255-7, 1968.
  41. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Report on the Tuberculosis Epidemic. Tuberculosis (TB) Annual Report - DOTS (Directly Observed Treatment, Short-course) - A Breakthrough in TB Control, 40 p., 1997.
  42. YAMAMOTO, S.; TOIDA, I.; WATANABE, N. and URA, T. In vitro antimycobacterial activities of pyrazinamide analogs. Antimicrob. Agents Chemother., 39: 2088-91, 1995.
  43. YEW, W.W. and CHAU, C.H. Drug-resistant tuberculosis in the 1990s. Eur. Resp. J., 8: 1184-92, 1995.
  44. YOUNG, D.B. Strategies for new drug development. In: Bloom, B.R. (ed.) Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1st Ed., 1994, p. 559-567.

Recebido para publicação em 13/04/98

## AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DOENÇA MENINGOCÓCICA PELOS LABORATÓRIOS REGIONAIS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Marilu Mendes Moscardini ROCHA\*  
Maria Regina Novaes Ramires ESPER\*\*  
Suzel Nogueira NEME\*\*\*  
Marta Inês Cazentini MEDEIROS\*\*\*\*  
Regina Ruivo Ferro e SILVA\*\*\*\*\*  
Antonio Luiz Vicente ARREAZA\*\*\*\*\*  
Waldemar EBNER FILHO\*\*\*\*\*  
Ivete A.Zago Castanheira de ALMEIDA\*\*\*\*\*  
Margarida Georgina BASSI\*\*\*\*\*  
Eliani ARAÚJO\*\*\*\*\*

RIALA 6/848

ROCHA., M.M.M., ESPER, M.R.N.R., NEME, S.N., MEDEIROS, M.I.C., SILVA, R.R.F., ALMEIDA, I.A.Z.C., BASSI, M.G., ARREAZA, A.L.V., EBNER FILHO, W., ARAÚJO, E. Avaliação do diagnóstico laboratorial da doença meningocócica pelos laboratórios regionais do Instituto Adolfo Lutz. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 33-39, 1999.

RESUMO: 31.833 amostras de líquido céfalo-raquidiano foram processadas nos Laboratórios Regionais de Campinas, Presidente Prudente, Ribeirão Preto, Santo André, Santos, São José do Rio Preto e Sorocaba, no período de 1989 a 1995. A metodologia utilizada para transporte, semeadura e identificação do agente etiológico foi a recomendada pelo Centro Nacional de Referência para meningite, Instituto Adolfo Lutz, Ministério da Saúde. Foram diagnosticados um total de 1.748 casos de meningite meningocócica. Destes, 91 (5,20%) casos foram definidos somente pela bacterioscopia e 24 (1,54%) cepas de *Neisseria meningitidis* não puderam ser sorogrupadas. Das 1630 cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupadas, o sorogrupo mais frequente foi o B com 848 (52,02%), seguido de 743 (45,58%) C, 30 (1,84%) W135, 3 (0,18%) Y e 1 (0,06%) X. É digno de nota a ocorrência de 5 casos de meningococo A, exclusivamente diagnosticados pela reação de imunoeletroforese cruzada. A maior positividade foi encontrada na cultura (87,4%), seguida pela bacterioscopia (75,3%) e imunoeletroforese cruzada (54,8%). A variação sazonal dos casos foi como esperado, com alta incidência no inverno. A melhoria do diagnóstico etiológico e das ações de vigilância da doença meningocócica foi demonstrada pelo aumento progressivo no número de casos diagnosticados pelos laboratórios desde 1989.

UNITERMOS: doença meningocócica, meningite meningocócica, métodos diagnóstico, sorogrupo, líquido.

### INTRODUÇÃO

A doença meningocócica (DM) tem sido descrita desde o século XVI e continua sendo um sério problema

de Saúde Pública pela alta taxa de morbidade e mortalidade com a qual está associada. Epidemias acometem países de diferentes níveis sócioeconômicos<sup>19</sup>.

No Brasil, a DM foi observada pela primeira vez

\* Laboratório Regional de Campinas,  
\*\* Laboratório Regional de Presidente Prudente,  
\*\*\* Laboratório Regional de Ribeirão Preto,  
\*\*\*\* Laboratório Regional de Santo André,  
\*\*\*\*\* Laboratório Regional de Santos,  
\*\*\*\*\* Laboratório Regional de São José do Rio Preto,  
\*\*\*\*\* Laboratório Regional de Sorocaba.

em São Paulo em 1906 mantendo-se sob forma endêmica até 1945<sup>23</sup>, quando se iniciou uma epidemia que teve seu pico em 1947 e foi causada pela *Neisseria meningitidis* sorogrupo A, segundo relato de Gomes e colaboradores<sup>13</sup>.

Na década de 70, o Brasil vivenciou duas extensas epidemias. A primeira foi provocada pela *Neisseria meningitidis* sorogrupo C e a segunda pela *Neisseria meningitidis* sorogrupo A. Após a campanha de vacinação contra os sorogrupos A e C realizada em 1975, a incidência desta morbidade voltou a níveis endêmicos, porém, atingiu novamente índices de alerta na Grande São Paulo em 1986/1987. Esta nova epidemia, causada pela *Neisseria meningitidis* sorogrupo B, atingiu índices epidêmicos em 1988<sup>7 9 10 17</sup>. A doença meningocócica apresentou no entanto, algumas alterações na Grande São Paulo a partir de 1989. A proporção de *Neisseria meningitidis* C passou de 9% em 1986 a 14% em 1989, atingindo a proporção de 46% dos casos da doença diagnosticados laboratorialmente, em 1990<sup>8</sup>.

A manutenção de um sistema rigoroso de Vigilância Epidemiológica apoiado ao diagnóstico laboratorial é essencial no sentido de avaliar a tendência real da doença através da determinação dos sorogrupos e outros marcadores epidemiológicos incidentes<sup>14 20</sup>.

Diante da suspeita clínica de meningite, o exame laboratorial do líquido cefalorraquidiano (LCR) é o suporte para o diagnóstico e tratamento adequados do paciente, e indicação de quimioprofilaxia aos comunicantes. Assim, os resultados de exames laboratoriais passam a ser tão importantes quanto outras variáveis na avaliação epidemiológica da doença, inclusive, do ponto de vista da qualidade dos serviços e do Sistema de Vigilância Epidemiológica<sup>1,16,22</sup>.

O exame bacterioscópico é um diagnóstico presuntivo de grande importância na orientação terapêutica. A pesquisa de antígenos polissacarídeos pela reação de aglutinação pelo látex e de precipitação pela imuno-elektroforese cruzada (IEC) permite a determinação do sorogrupo do meningococo e fornece diagnósticos diferenciais mais rápidos das meningites bacterianas. Mas, para que se consiga resultados laboratoriais mais específicos do meningococo, como a sensibilidade aos agentes antibacterianos, a identificação de seu sorogrupo, sorosubtipo, imunotipo e ainda o seu tipo eletroforético, é de fundamental importância o isolamento do agente etiológico pela cultura, pois somente desta forma é que se permite a melhor compreensão da epidemiologia da doença meningocócica<sup>14</sup>.

A rede de Laboratórios de Saúde Pública tem papel fundamental na elucidação dos agentes etiológicos das meningites bacterianas, pois utiliza metodologia laboratorial padronizada, e a sua distribuição geográfica permi-

te o trabalho mais articulado com as Vigilâncias Epidemiológicas Regionais.

Com o objetivo de analisar aspectos do comportamento da DM com fundamento em dados da Rede de Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz, foi realizado um estudo retrospectivo do período de 1989 a 1995, relacionando a proporção de casos suspeitos que puderam ser confirmados por bacterioscopia, cultura e IEC à identificação dos diferentes sorogrupos da *Neisseria meningitidis* e sua distribuição em áreas geográficas distintas do Estado de São Paulo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo realizado no período de 1989 a 1995, envolveu os Laboratórios Regionais de Campinas, Presidente Prudente, Ribeirão Preto, Santo André, Santos, São José do Rio Preto e Sorocaba. Foram analisadas 31.883 amostras de LCR de casos suspeitos de meningite, procedentes das respectivas regiões.

Estudou-se os 1748 casos confirmados laboratorialmente como DM, considerando como caso confirmado, aquele paciente que apresentou sintomas clinicamente compatíveis com a identificação de *N.meningitidis* ou seu antígeno a partir do exame de LCR ou seja, apresentou pelo menos um dos exames laboratoriais positivos em relação ao meningococo.

A avaliação do diagnóstico laboratorial se baseou na proporção em que foi possível identificar o agente etiológico e através de qual método.

Os exames utilizados no diagnóstico laboratorial da meningite meningocócica foram: bacterioscopia, cultura e IEC.

Para a bacterioscopia, a coloração utilizada foi o método de Gram, modificado por Hucker, com centrifugação do LCR caso se apresentasse límpido ou levemente turvo.

Para a realização da cultura o LCR foi imediatamente semeado (5 a 10 gotas) em tubos de ágar Mueller-Hinton chocolate 5% (sangue de carneiro) os quais foram incubados em atmosfera de 5% a 10% de CO<sub>2</sub> e umidade, a 37°C, durante 24 a 48 horas. Após o isolamento da bactéria procedeu-se à sua identificação pelos métodos usuais, sendo que no caso de meningococo foram: bacterioscopia pelo método de Gram, prova de oxidase, utilização de açúcares (dextrose, maltose, levulose, lactose) e aglutinação em lâmina com soros aglutinantes anti meningococo grupo específico<sup>6</sup>.

Foram consideradas como *Neisseria meningitidis*, as bactérias que se apresentaram sob a forma de diplococos Gram negativos com prova de oxidase positiva, utilizando dextrose e maltose.



A pesquisa de antígenos de meningococo no LCR pela IEC foi realizada em fita de acetato de celulose usando tampão barbital, pH 8,6, força iônica 0,05, sob a amperagem constante de 30 mA por 10 minutos. As fitas foram lavadas durante uma hora em solução salina 0,85%, coradas com Ponceau S por 5 minutos e descoradas em ácido acético a 5%<sup>6,18</sup>.

Soros aglutinantes e precipitantes anti *Neisseria meningitidis* sorogrupos A, B e C, e antígenos específicos utilizados neste estudo foram produzidos na Divisão de Biologia Médica do IAL Central, São Paulo.

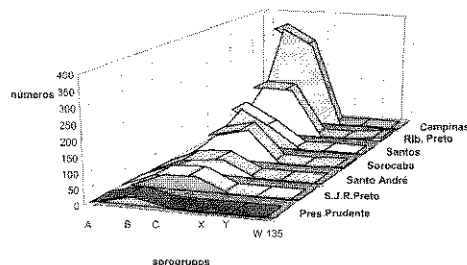
TABELA 1

População de abrangência das regiões estudadas e número de DM em relação ao número de amostras analisadas, no período de 1989 a 1995.

Cidades da Região	População de Amostras	Total de N° (%)	Casos
Campinas	4.732.341	8901	688 (7,73)
Ribeirão Preto	2.718.066	3376	376 (11,14)
Santos	1.308.813	2042	231 (11,31)
Sorocaba	2.168.691	4287	192 (4,48)
Santo André	2.235.890	4172	119 (2,85)
S.J.Rio Preto	1.197.264	7742	104 (1,34)
Pres. Prudente	639.326	1363	38 (2,79)
<b>Total</b>	-	<b>31883</b>	<b>1748 (5,48)</b>

GRÁFICO 1

Distribuição de casos de doença meningocócica confirmados pelos Lab. Regionais do Instituto Adolfo Lutz segundo o sorigrupo, no período de 1989 e 1995.



RESULTADOS

A população das regiões de abrangência de cada um dos Laboratórios Regionais, o número total de amostras de LCR analisadas, bem como o total de casos de doença meningocócica confirmados nestes laboratórios estão expressos na tabela 1.

A distribuição dos casos de DM, segundo sorogrupo, confirmados pela Rede de Laboratórios Regionais do IAL está representada no gráfico 1.

No período de 1989 a 1995, verificou-se um aumento crescente do número de amostras processadas e de diagnósticos positivos, considerando as várias regiões do Estado que participaram do trabalho.

De um total de 31.883 amostras de LCR analisados, foram diagnosticados 1.748 casos de DM, sendo que 91 (5,20%) casos foram definidos apenas por bacterioscopia e 27 (1,54%) cepas de *Neisseria meningitidis* não puderam ser sorogrupadas. Das 1.630 cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupadas verificou-se maior frequência para o sorogrupo B com 848 (52,02%) cepas, seguido de 743 (45,58%) C, 30 (1,84%) W135, 3 (0,18%) Y e 1 (0,06%) X. Deve ser comentada a ocorrência de 5 casos de *N. meningitidis* do sorogrupo A (tabela 2).

TABELA 2

Distribuição dos casos de DM confirmados pelos laboratórios regionais do Instituto Adolfo Lutz, segundo bacterioscopia e sorogrupo dos meningococos, no período de 1989 a 1995.

ANO	Total amostras	Total de casos Positivos	Sorogrupos						Não sorogrupados	DGN
			A	B	C	X	Y	W135		
<b>1989</b>	<b>3881</b>	<b>118</b>	<b>1</b>	<b>79</b>	<b>22</b>	-	-	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>7</b>
1990	3688	193	1	116	58	-	-	4	4	10
<b>1991</b>	<b>4928</b>	<b>266</b>	<b>1</b>	<b>100</b>	<b>144</b>	-	-	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>13</b>
1992	4813	227	1	101	102	-	2	2	5	14
<b>1993</b>	<b>4097</b>	<b>305</b>	-	<b>136</b>	<b>144</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>12</b>
1994	5071	301	1	150	120	-	-	4	2	24
<b>1995</b>	<b>5405</b>	<b>338</b>	-	<b>166</b>	<b>153</b>	-	-	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>11</b>
<b>TOTAL</b>	<b>31883</b>	<b>1748</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>743</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>30</b>	<b>27</b>	<b>91</b>

TABELA 3

Porcentagem de positividade de cada um dos exames laboratoriais em relação ao número de amostras de LCR, de casos suspeitos de DM encaminhados aos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz / 1989 a 1995.

RESULTADOS	BACTERIOSCOPIA	CULTURA	IEC
POSITIVO	758	1337	717
NEGATIVO	248	193	592
TOTAL	1006	1530	1309
POSITIVIDADE	75,3 %	87,4 %	54,8 %

A tabela 3, demonstra a positividade para cada um dos exames laboratoriais do LCR onde é possível verificar que a cultura apresenta maior positividade (87,4%), seguida pela bacterioscopia (75,3%) e a IEC (54,8%).

É importante relatar que a positividade da IEC em amostras de LCR dos casos em que a cultura resultou positiva foi de 43% (307 IEC/714 culturas) para o meningococo B e de 72,6% (405 IEC / 558 culturas) para o meningococo C. Ainda de acordo com estes dados, salientamos que os 5 meningococos do sorogrupo A foram determinados exclusivamente pela reação sorológica (IEC).

A variação temporal dos casos da doença meningocócica obedece à sazonalidade sendo acentuada nos meses de inverno 618 (35,35%), seguido da primavera 459 (26,26%), caindo no verão 288 (16,48%) e voltando a demonstrar crescimento no outono 383 (21,91%).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O diagnóstico etiológico das meningites bacterianas oferece vantagens significativas em nível clínico no direcionamento de terapia antimicrobiana e na projeção eventual da doença.

Determinados sorotipos do meningococo geralmente estão associados a doença invasiva, enquanto que outros são observados em portadores, sendo fundamental para a adoção de medidas de controle o conhecimento dos diversos sorogrupos e sorotipos<sup>14</sup>.

Apesar do trabalho articulado entre a Rede de Laboratórios de Saúde Pública e as Vigilâncias Epidemiológicas Regionais visando a identificação do agente etiológico da DM, existem dificuldades, seja porque não

são colhidos materiais necessários para os exames laboratoriais, ou por falta de recursos para encaminhamento desses materiais aos laboratórios de referência.

Conforme foi observado por MELLES et al.<sup>16</sup>, maiores dificuldades são encontradas no diagnóstico laboratorial quando o liquor colhido é semeado e transportado de forma inadequada, o que facilita a desintegração dos microorganismos, dificulta a leitura do exame bacterioscópico e o desenvolvimento em meios de cultura próprios. O uso de antibiótico prévio, da mesma forma, irá interferir na interpretação de um esfregaço corado e principalmente na positividade da cultura<sup>15</sup>.

Mesmo convivendo com as dificuldades citadas, o trabalho desenvolvido pela Rede de Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz veio contribuir para uma análise mais segura do perfil epidemiológico da DM no interior do Estado de São Paulo. Segundo dados da Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória do Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretária da Saúde do Estado de São Paulo, foi observado um aumento no total da determinação dos sorogrupos de DM no interior do Estado de São Paulo, no período de 1989 a 1995, a que se refere este estudo. Em 1989, determinou-se o sorogrupo em 36% dos casos de doença meningocócica, enquanto que em 1995 foram sorogrupoados 53,7% do total de casos.

É importante, porém, salientar as possíveis limitações destes dados obtidos de Vigilância. Embora eles possam fornecer a curva de tendência da DM, os casos não notificados limitam a análise do comportamento epidemiológico da doença. Apesar de ser compulsória a notificação dos casos suspeitos de meningite em todo território nacional, é certo que existem subnotificações. Por outro lado, entre os casos confirmados clinicamente pela presença de meningococcemia, pode haver alguns que sejam de outra etiologia bacteriana.

Camargo<sup>9</sup> relata que no município de São Paulo, no período de 1988 a 1993, somente em 39% dos casos de DM foi possível identificar o sorogrupo. Por outro lado, Kemp<sup>14</sup> refere a identificação do agente etiológico com sorogrupo em 56,9% dos casos de DM internados em hospital no município de Campinas, interior do Estado de São Paulo, no período de 1988 a 1991.

Em outros países, observam-se percentuais maiores de identificação dos sorogrupos. WHALEN et al.<sup>16</sup> referem que no Canadá em 1985, 60% dos casos de DM foram sorogrupoados, percentual este que aumenta para 88% em 1992. PINNER et al.<sup>21</sup> referem em seis áreas dos Estados Unidos da América, no período de 1986 a 1987, 71% dos casos de DM com informação sobre sorogrupo.

No período deste estudo, houve predominância do meningococo B seguido do C, acompanhando o perfil epidemiológico da DM no Brasil como um todo, de acor-

do com dados do Ministério da Saúde<sup>3</sup> e em algumas regiões em especial, como o município do Rio de Janeiro, onde, segundo GAMA et al.<sup>12</sup> houve predominância de 80% do meningococo B nos casos sorogrupo B no período de 1987 a 1994. No Laboratório Central do Estado de Santa Catarina, observou-se que, no período de 1981 a 1996, o sorogrupo B correspondia a 65 % dos casos sorogrupo B<sup>5</sup>. De um modo geral, na década de 80 a grande parte dos casos de DM registrados no mundo, foram causados pelo meningococo B<sup>24</sup>. Em países da África, epidemias têm sido causadas pelo sorogrupo A<sup>4,25</sup>.

A positividade dos exames de LCR analisados mostrou-se maior na cultura, seguida da bacterioscopia, com valores mais baixos verificados na IEC. O índice de positividade conseguido na cultura (87,4%) pode ser considerado como ótimo desempenho das atividades propostas para melhoria do diagnóstico laboratorial da DM.

Alguns autores como ALKMIN<sup>2</sup> e GHANASSIA<sup>11</sup> relatam problemas com a sensibilidade da IEC para detecção do polissacáride do meningococo B, às vezes, não obtendo sucesso na pesquisa deste antígeno mesmo quando a cultura é positiva. A detecção da *N. meningitidis* B em fluidos corpóreos tem sido dificultada pela ausência de um potente antissorogrupos específico devido a pouca imunogenicidade deste polissacáride bacteriano. A IEC apesar de não ser um método muito sensível, apresenta uma boa especificidade e pode revelar, neste estudo, 54,8% dos casos de DM. Para a Rede de Laboratórios de Saúde Pública, no nosso entender ainda é um exame que deve ser realizado, até mesmo como triagem para aplicação de outros métodos indiretos de diagnóstico com maior sensibilidade, desde que a cultura seja negativa. Esta nossa sugestão se baseia no fato de que os antissoros para aplicação do teste são fornecidos gratuitamente pelo Instituto Adolfo Lutz e que em uma tira de acetato de celulose podem ser realizados até cinco testes. Desta forma não irá onerar em muito o laboratório desde que se tenha o equipamento necessário e o técnico bem treinado.

Deve-se salientar que na fase inicial da doença, antígenos bacterianos podem não estar ainda presentes no LCR, conduzindo a um teste imunológico negativo; torna-se então necessário associar sempre os métodos imunológicos para pesquisa de antígenos às técnicas bacteriológicas clássicas. A realização da cultura é imprescindível para o conhecimento do perfil epidemiológico das cepas circulantes, gerando conhecimentos e informações fundamentais ao controle da DM.

Vários autores<sup>1,14,15,16</sup> têm recomendado a utilização de métodos laboratoriais associados para elevar o número de casos com o agente etiológico identificado. Para o aprimoramento das ações relativas ao laboratório quanto ao estudo epidemiológico da DM é primordial a conscientização do pessoal médico, no sentido de que sejam solicitados todos os exames necessários para o diagnóstico completo dos casos suspeitos, assim como, a adequação dos serviços médicos na realização da coleta, semeadura, transporte e conservação dos meios biológicos da melhor forma possível. São medidas que vêm contribuir de maneira essencial para a eficiência dos métodos de diagnóstico e confiabilidade dos resultados.

Este aprimoramento já pode ser observado com o aumento dos casos diagnosticados da DM a partir de 1989, que com certeza se deu pela maior integração entre a clínica, o laboratório e a epidemiologia.

Esta hipótese pode ser confirmada pelo aumento de casos diagnosticados pela cultura, o que significa que houve maiores cuidados com o LCR e ainda pelo fato de que nestes anos do estudo, para efeito de comparação, nenhuma modificação foi efetuada pelo laboratório nos métodos utilizados para o diagnóstico das meningites bacterianas.

#### AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Dr. Carmo Elias Andrade Melles pelas sugestões e leitura do texto.

ROCHA., M.M.M., ESPER, M.R.N.R., NEME, S.N., MEDEIROS, M.I.C., SILVA, R.R.F., ALMEIDA, I.A.Z.C., BASSI, M.G., ARREAZA, A.L.V., EBNER FILHO, W., ARAÚJO, E. - Laboratorial diagnosis evaluation of meningococcal disease by the regional laboratories of Instituto Adolfo Lutz. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1), 33-39, 1999.

ABSTRACT: 31,883 samples of cerebrospinal fluid were processed in the regional laboratories of Campinas, Presidente Prudente, Ribeirão Preto, Santo André, Santos, São José do Rio Preto, and Sorocaba from 1989 to 1995. The methodology used for transport, inoculation and identification of ethiological agent was that recommended by the National Reference Center for Meningitis, Instituto Adolfo Lutz, Health Ministry. A total of 1.748 positive cases of meningococcal meningitis were diagnosed. Ninety-one of these cases (5.20%) were defined only by bacterioscopy and 24 strains of *Neisseria meningitidis* (1.54%) were not serogrouped. Among the 1.630 strains of *Neisseria meningitidis* serogrouped, the most frequent group was B with 848 (52.02%) strains, followed by 743 (45.58%) C, 30 (1.84%) W135, 3 (0.18%) Y and 1 (0.06%) X. A noteworthy fact was the occurrence of 5 cases of meningococci of serogroup A exclusively diagnosed by the counterimmunoelectrophoresis reactions (CIE). The highest positivity was observed in culture (87.4%) followed by microscopy examination (75.%) and CIE (54.8%). The seasonal variation of the cases was as expected, with a higher incidence in winter. The improvement of the ethiological diagnosis and of surveillance actions of meningococcal disease was demonstrated by the progressive increase in number of cases diagnosed by laboratory, since 1989.

KEYWORDS: Meningococcal disease, Meningococcal meningitis, diagnosis methods, serogroup, cerebrospinal Fluid.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALKMIN, M.G.A.; LANDGRAF, I.M. & MELLES, C.E.A. Avaliação do Teste de Látex comparativamente à cultura e à Imunoelectroforese Cruzada no diagnóstico de meningites bacterianas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **55**: 19-24, 1995.
2. ALKMIN, M.G.A.; LANDGRAF, I.M. & VIERIA, M.F.P. Contribuição da Imunoelectroforese Cruzada em líquido cefalorraquidiano e/ou soro no diagnóstico de infecções por *Neisseria meningitidis* grupo B no Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **56** (1): 13-17, 1996.
3. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília, Ministério da Saúde GT. Meningite/ CNDI/ CENEPI/ FNS., fevereiro 1996.
4. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília, Ministério da Saúde GT. Meningite/ CNDI/ CENEPI/ FNS., abril 1996.
5. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília, Ministério da Saúde GT. Meningite/ CNDI/ CENEPI/ FNS., janeiro 1997.
6. BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Ações Básicas da Saúde. Divisão Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. Normas Técnicas para o diagnóstico das Meningites Bacterianas. Brasília. Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 49p. (Série A: Normas e Manuais Técnicos, 32) 1986.
7. CAMARGO, M.C.C. & HIDALGO, N.T.R. Doença Meningocócica: A vacina contra o meningococo B e a situação atual na Grande São Paulo. *Imunizações - Atualização. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Unicef*. **2** (2): 161-167, 1989.
8. CAMARGO, M.C.C. & HIDALGO, N.T.R. A Doença Meningocócica na Grande São Paulo. *Imunizações*, **3**: 4-7, 1990.
9. CAMARGO, M.C.C. Doença meningocócica no Município de São Paulo, no período de 1979 a 1993, endemia e epidemia, São Paulo, 1996 [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Saúde Pública da USP].
10. DOENÇAS IMUNOPREVENÍVEIS. Avaliação da meningite no Brasil. Ano VIII n 8 - Agosto 1994, Ministério da Saúde.
11. GHANASIA, J.P.; SLIM, A.; BEREGIN, E.B. & MADALL, J. Failure of dianozing group B meningococcal meningitidis in immunoelectrophoresis. *Scand. J. Infect. Dis.* **9**: 313-314, 1997.

12. GAMA,S.G.N.; MARZOCHI,K.B.F. & SILVEIRA FILHO,G.B. Caracterização epidemiológica da doença meningocócica na área metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil, 1976 a 1994. *Rev. Saúde Pública*, **31**(3): 254-262,1997.
13. GOMES,S.L.; SILVA,M.B.; RIBAS,J.C.; RUGAIE.; AMOROSINO,A. & CAVE,J.J.D. Meningite cerebrospinal e sulfamidação maciça, preventiva. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **10**: 77- 85, 1950.
14. KEMP,B. Aspectos epidemiológicos e diagnóstico laboratorial da Doença Meningocócica no município de Campinas / SP no período de 1988 a 1993, 1994 [ Tese de mestrado, Faculdade de Saúde Pública da USP ].
15. MELLES,C.E.A.; LANDGRAF,I.M. & BARTA,R.C.B. Meningites, interferência de antibacterianos presentes no líquido cefalorraquidiano no diagnóstico etiológico. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* , **48**(1/2): 43-47,1988.
16. MELLES,C.E.A.; LANDGRAF,I.M.; FARACO,M.L. & BASCARDI,M.N.B. Valor da bacterioscopia, cultura e imunoelctroforese cruzada no diagnóstico das meningites bacterianas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* , **49** (1 ): 61-67 ,1989.
17. MILAGRES,L.G.; RAMOS,S.R.; SACHI,C.T.; MELLES,C.E.A; VIEIRA,U.S.D.; SATA,M.; BRITO,G.S.; MORAES,J.C. & FRASCH,C.E. Immune Response of Brazilian Children to a *N. meningitidis* serogroup B outer membrane Protein Vaccine. Comparison with efficacy. *Infection and Immunity*. **62** : 4419-4424,1994.
18. PALHARES,M.; GELLI,D.S.; ALMEIDA,M.C.R.; MELLES,C.E.A. TAKEDA,A.E.; TAUNAY,A.E. Pesquisa de polissacáride de *Neisseria meningitidis* do grupo C no líquido cefalorraquidiano por Imunoelctroforese Cruzada em acetato de celulose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **33**: 85-89, 1973.
19. PELTOLA,M. Meningococcal disease: still with us. *Rev. Infect. Dis.* **5**: 71-91,1983.
20. PINHEIRO,S.A.;FUJINAMI,A.K.; RUFFINO NETO,A.; SANTIAGO,R.C. Alguns aspectos da meningite meningocócica no município de Ribeirão Preto, S.P. *Medicina, Ribeirão Preto*, **24** (4) : 204-211, 1991.
21. PINNER,R.W. ;GELLIN,B.G. ;BIBB,W.F. ; BAKER,C.N. ; WEAVER,R. ;HUNTER,S.B. ; WATERMAN,S.H. ; MOCCA,L.F. ; FRASCH,C.E. ; BROOME,C.V and the Meningococcal Disease Study Group. Meningococcal disease in the United States - 1986. *J. Infect. Dis*, **164**: 368-374,1991.
22. REQUEJO,H.I.Z.; NASCIMENTO,C.M.P.C & FAHRAT,C.K. Comparison of Counterimmunoelectrophoresis, Latex Agglutinations and Bacterial Culture for the Diagnosis of Bacterial Meningitidis using urine, serum and cerebrospinal fluid samples. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **25**: 357-367, 1992.
23. SCHIMID, A.W & GALVÃO, P.A.L.A. Alguns aspectos epidemiológicos da meningite meningocócica no município de São Paulo. *Arq. Hig.Saúde publ.***26** (87) : 15-39,1961
24. SCHWARTZ,B.; MOORE,P.S. & BROOME,C.V. Global epidemiology of meningococcal disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2**: S118-S124, 1989.
25. TIKHOMIROV,E. Meningococcal meningitis: global situation and control measures. *World Health Statistics*, **40**: 98-108, 1987.
26. WHALEN,C.M.;HOCHIN,J.C.; RYAN,A. & FRASER,A. The changing epidemiology of invasive meningococcal disease in Canada. *JAMA*, **273**(5): 390- 394, 1995.

Recebido para publicação em 16/04/98

**SALMONELLA: DETERMINAÇÃO DE SOROTIPOS E RESISTÊNCIA A AGENTES  
ANTIMICROBIANOS DE CEPAS ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO  
COMERCIALIZADAS NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP**

Jacqueline Tanury Macruz PERESI\*  
Ivete Aparecida Zago Castanheira de ALMEIDA\*  
Sonia Isaura de LIMA\*  
Sueli Aparecida FERNANDES\*\*  
Ana Terezinha TAVECHIO\*\*  
Dilma Scala GELLI\*\*

RIALA 6/849

PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; LIMA, S.I.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T. e GELLI, D.S.- *SALMONELLA*: Determinação de sorotipos e resistência a agentes antimicrobianos de cepas isoladas de carcaças de frango comercializadas na região de São José do Rio Preto - SP. *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, 58(1): 41-46 1999.

**RESUMO:** De abril de 1995 a dezembro de 1996, foram estudadas 160 amostras de carcaças de frango, comercializadas na região de São José do Rio Preto - SP. Foram determinados os sorotipos e perfis de sensibilidade aos agentes antimicrobianos de todas as cepas de *Salmonella* isoladas. Das carcaças analisadas, 54,38% estavam contaminadas por *Salmonella*. Foram identificados 18 diferentes sorotipos, dentre os quais *Salmonella* Enteritidis correspondeu a 59,77%. Verificou-se que 13,79% das cepas de *Salmonella* apresentaram resistência aos agentes antimicrobianos testados. Os resultados obtidos demonstraram o alto índice de contaminação por *Salmonella* em carne de frango. Considerando o consumo de alimentos de origem animal, principalmente de aves, por um grande número de pessoas, este fato possivelmente tem propiciado a ocorrência de numerosos surtos por *S. Enteritidis* na nossa região, nos últimos anos.

**DESCRITORES:** Carcaça de frango, *Salmonella*, sorotipos, resistência antimicrobiana.

## INTRODUÇÃO

No gênero *Salmonella* estão classificados 2435 diferentes sorotipos de acordo com a caracterização bioquímica e sorológica<sup>17</sup>. Muitos destes sorotipos são responsáveis por graves casos de infecções humanas esporádicas e também por surtos. A ocorrência de cepas, consideradas selvagens, resistentes aos antimicrobianos é fato preocupante, quando observadas as características de patogenicidade da bactéria em questão e a possibilidade de infecções extra-intestinais, decorrentes de gas-

troenterites em grupos mais sensíveis da população, como são as crianças, idosos, imunossuprimidos e imunocomprometidos<sup>21</sup>.

As enfermidades transmitidas por alimentos (ETAs) representam um importante problema de saúde pública, não somente nos países desenvolvidos mas também naqueles em desenvolvimento<sup>23</sup>.

Os alimentos de origem animal e seus derivados, contaminados por *Salmonella*, têm sido a maior fonte de infecções em humanos<sup>14</sup>. Dentre estes alimentos, a carne de frango e os ovos, consumidos por todas as classes

\* Instituto Adolfo Lutz- Lab. I de São José do Rio Preto — Rua Alberto Sufredini, 2325 - Tel. (017) 224.2602 — CEP 15.060-020 -São José do Rio Preto - SP.

\*\* Instituto Adolfo Lutz- Lab. Central - São Paulo.

sociais, tem sido os veiculadores de numerosos casos de infecções humanas, por *Salmonella*. O sorotipo predominante nestes alimentos é *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis (*S. Enteritidis*) que nos últimos anos tem sido a causa de numerosos surtos relatados em várias partes do mundo e também no Brasil, incluindo o Estado de São Paulo<sup>1, 8,9,12,16,23</sup>. O estudo relatando 23 surtos por *S. Enteritidis* na região de São José do Rio Preto (no prelo), corrobora a importância e significado desta contaminação em termos de saúde pública.

As aves podem ser contaminadas por *Salmonella* ainda nas granjas por diversas fontes, como introdução de lotes de aves infectadas, ambiente e ração contaminada<sup>4</sup>. A contaminação das rações pode ser decorrente de matéria prima<sup>11</sup>, e pode ser agravada pelo uso não correto de antibióticos, que favorecem o surgimento de cepas resistentes<sup>22</sup>. Durante seu armazenamento, a presença de roedores e outros animais domésticos e silvestres, é outra fonte possível de contaminação de rações<sup>21</sup>. Evidências e estudos têm indicado que a utilização de produtos químicos, como o ácido fórmico associado ao ácido propiônico, assim como o processo térmico da peletização, contribuem para diminuir os níveis de contaminação das rações<sup>18</sup>. Estas medidas, associadas a programas de desinfecção ambiental de granjas, são necessárias, tendo em vista a busca de solução de problemas relacionados com a criação de aves e a postura de ovos em grande escala<sup>10</sup>.

Entretanto, a transmissão vertical, observada em alguns sorotipos como *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Enteritidis*, representa também uma forma de manutenção da infecção através das gerações de significativa importância<sup>3</sup>. Estas aves, durante o processo de abate podem favorecer a disseminação da bactéria no ambiente do abatedouro e também entre as carcaças que são destinadas ao consumo humano<sup>5</sup>, podendo estas ainda serem contaminadas durante o armazenamento ou na exposição nos pontos de comercialização.

Considerando as implicações de saúde pública relacionadas com as salmonelas, o presente trabalho tem por objetivo relatar os sorotipos isolados a partir de carcaças de frango, assim como verificar o perfil de sensibilidade dos mesmos aos agentes antimicrobianos disponíveis para o tratamento das infecções animais e humanas por essa enterobactéria.

## MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de abril de 1995 a dezembro de 1996, foram encaminhadas 160 amostras de carcaças de frango ao Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de São José do Rio Preto.

As amostras eram procedentes de coletas realizadas pelo Grupo Técnico da Vigilância Sanitária, DIR XXII de S.J.R.Preto. Segundo informações do referido órgão, as amostras foram coletadas em nível de mercado local (supermercados, casas de carne, etc.).

As amostras foram recebidas em embalagem original, acondicionadas em saco plástico fechado, resfriadas ou congeladas. Na embalagem original, constava a marca do produto, porém sem especificar necessariamente o abatedouro ou granja. As 160 amostras referiam-se a 8 marcas diferentes, codificadas de A a H pelo laboratório.

Para a determinação de Presença/Ausência de *Salmonella* na carcaça, foi procedida análise conforme segue: cada carcaça foi retirada de sua embalagem original e acondicionada em saco plástico, onde, foi vertido 225 ml de Água Peptonada a 1%, Tamponada (APT). Procedeu-se o enxágüe da carcaça em APT, por agitação do conjunto e manualmente. O APT foi então vertido em frasco estéril para a etapa de pré-enriquecimento não seletivo (incubação por 18-24h a 35°C). Após esse período, alíquotas de APT foram semeadas em caldos de enriquecimento seletivo (Rappaport-Vassiliadis modificado, Selenito-Cistina e Tetracionato segundo Kauffmann), todos incubados a 42°C por 24-48h. Na sequência, foi realizado o isolamento em meios seletivos diferenciais (agares Mc.Conkey (MC), Brilliant Green (BG) e Xylose-Lysine-Tergitol 4 (XLT4)) por estrias na superfície e incubados por 24h a 35°C, identificação presumtiva de colônias isoladas a partir dos agares em meio IAL<sup>15</sup> e caracterização das mesmas por sorologia polivalente O e H de *Salmonella*. Estas etapas foram conduzidas por metodologia recomendada por FLOWERS e cols<sup>6</sup>, modificada no que se refere à substituição do caldo de pré-enriquecimento, do meio de identificação presumtiva e da temperatura de incubação dos três meios de enriquecimento seletivo e ainda, inclusão dos meios BG, XLT4 e Rappaport-Vassiliadis modificado.

As cepas isoladas foram encaminhadas à Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz-São Paulo, para confirmação do gênero e para caracterização do sorotipo, conforme metodologia descrita por Popoff e Le Minor<sup>17</sup>.

Os testes de sensibilidade foram realizados a partir de cada cepa isolada e identificada. O método usado foi de difusão em ágar, conforme descrito por Bauer e cols<sup>2</sup>. Foram utilizados discos da marca Cecon impregnados com os antibióticos abaixo identificados, nas concentrações assinaladas: cefalotina-CF (30 µg); carbenicilina-CR (100 µg); sulfonamidas-SF (300 µg); cefotaxima-CTX (30 µg); ciprofloxacina-CIP (5 µg); tetraciclina-TT (30 µg); cloranfenicol-CO (30 µg); gentamicina-GN (10 µg); ceftazidima-CAZ (30 µg); cefuroxima-CRX (30 µg); ampicilina-AP (10 µg); fosfomicina-FO (50 µg); kanamicina-KN (30 µg); sulfazotrim-SFT (25 µg) e cefoxitina-CFO (30 µg).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de positividade para presença de *Salmonella*, assim como a distribuição de sorotipos, estão descritos na Tabela 1. Observa-se que o número de amostras relacionadas com cada marca não é proporcio-

nal, porém está relacionado com a presença, frequência e distribuição das mesmas no mercado local, segundo informações da Vigilância Sanitária.

As carcaças contaminadas tem implicações epidemiológicas, especialmente se forem consideradas todas as possibilidades de contaminações cruzadas. Essas contaminações podem ocorrer tanto em refrigeradores domiciliares ou comerciais, quando alimentos já prontos para o consumo entram em contato direto ou indireto com produtos crus, como gotejamentos, ou sua introdução através de utensílios e/ou equipamentos que contenham resíduos da carne crua<sup>11,21</sup>.

A porcentagem de amostras positivas é de 54,38%, significativa e sugestiva de frequência da distribuição da

*Salmonella* em carcaças de aves, mostrando-se mais elevada quando comparada com os resultados encontrados por Gonzalez e cols<sup>7</sup> (40,74%) e Nascimento e cols<sup>13</sup> (12,24%) nas análises de carcaças de frango comercializadas na região do Grande Rio - RJ e oriundas do sul do país, respectivamente.

Foram isoladas 87 cepas de *Salmonella* e caracterizados 18 sorotipos identificados na Tabela 1. A elevada frequência de isolamento de *S. Enteritidis* (59,77%) nas carcaças analisadas pode estar associada ao intercâmbio comercial de matrizes de aves entre países<sup>8</sup>. Além disso, a sua capacidade de transmissão vertical às gerações subsequentes<sup>3</sup>, assim como sua presença no meio ambiente, permitiu a sua disseminação no nosso meio.

TABELA 1

Positividade e distribuição de sorotipos isolados segundo as marcas /No. Amostras analisadas

SOROTIPOS	MARCAS/Nº de Amostras - Nº Cepas isoladas								TOTAL/160	sorotipos % isolamento
	A/53	B/30	C/38	D/13	E/8	F/8	G/5	H/5		
<i>S. Enteritidis</i>	27	09	08	03	03	02	-	-	52	59,77
<i>S. Albany</i>	05	-	-	-	-	-	-	-	05	5,75
<i>S. Agona</i>	03	01	-	-	-	-	-	-	04	4,60
<i>S. enterica</i> subsp										
<i>enterica</i> cepa rugosa	01	-	-	-	-	01	02	-	04	4,60
<i>S. Mbandaka</i>	02	-	-	-	-	01	-	-	03	3,45
<i>S. Infantis</i>	-	02	-	-	-	-	-	01	03	3,45
<i>S. Gloucester</i>	-	03	-	-	-	-	-	-	03	3,45
<i>S. Schwarzengrund</i>	01	-	-	-	01	-	-	-	02	2,29
<i>S. enterica</i> subsp										
<i>enterica</i> , 1,13,19:___:___	-	-	-	-	-	-	02	-	02	2,29
<i>S. enterica</i> subsp										
<i>enterica</i> , 9,12:___:___	-	-	-	-	-	01	-	-	01	1,15
<i>S. enterica</i> subsp										
<i>enterica</i> , 4,12:gst:___	-	01	-	-	-	-	-	-	01	1,15
<i>S. Senftenberg</i>	01	-	-	-	-	-	-	-	01	1,15
<i>S. Ealing</i>	-	-	-	01	-	-	-	-	01	1,15
<i>S. Emek</i>	-	-	-	-	-	01	-	-	01	1,15
<i>S. Arechavaleta</i>	-	01	-	-	-	-	-	-	01	1,15
<i>S. Lexington</i>	01	-	-	-	-	-	-	-	01	1,15
<i>S. Livingstone</i>	-	01	-	-	-	-	-	-	01	1,15
<i>S. Hadar</i>	01	-	-	-	-	-	-	-	01	1,15
<b>TOTAL</b>	<b>42</b>	<b>18</b>	<b>08</b>	<b>04</b>	<b>04</b>	<b>06</b>	<b>04</b>	<b>01</b>	<b>87*</b>	<b>100%</b>

• 54,38% de amostras positivas para *Salmonella*

A variação de sorotipos encontrados sugere a contaminação das aves através de mais de uma fonte<sup>5,11</sup>, podendo ser uma das principais, o uso da ração preparada industrialmente como alimento exclusivo na avicultura em nível industrial<sup>11</sup>, possibilitando a disseminação nas aves, de sorotipos de *Salmonella* não adaptados ou comumente adaptados a elas.

Em relação aos testes de sensibilidade, a Tabela 2 apresenta a resistência aos agentes antimicrobianos verificada em 12 cepas (13,79%) pertencentes a 6 sorotipos. Não constam da Tabela os sorotipos e cepas que não apresentaram resistência, ou seja, as 75 (86,21%) cepas sensíveis. Nota-se que os sorotipos que apresentam resistência são os que podem ser considerados de maior importância à saúde pública<sup>19,20</sup>.



Pelos resultados dos testes de sensibilidade aos agentes antimicrobianos, observou-se que os sorotipos apresentaram índice relativamente baixo de resistência, próximo ao apresentado, por Vital Brazil e cols<sup>22</sup>.

Em relação à *S. Enteritidis*, a aquisição de resistência a mais de um antibiótico demonstrado por algumas cepas, também relatado por Tavechio e cols<sup>20</sup>, tem implicações epidemiológicas consideráveis e é notável quando se observa que sua prevalência é recente em nosso meio.

### CONCLUSÃO

Apesar de ser observado nesse trabalho uma grande porcentagem de cepas sensíveis a todos os agentes antimicrobianos testados, a detecção de cepas multirresistentes de *S. Enteritidis* é preocupante, uma vez que, além desse sorotipo ser o mais frequentemente isolado nesse estudo, ele também tornou-se o sorotipo predominante

em surtos de enfermidades transmitidas por alimento nos últimos anos no Estado de São Paulo.

A presença de cepas resistentes a agentes antimicrobianos dificulta a escolha terapêutica, representando um fator agravante no controle da infecção humana e animal.

Baseado na frequência da distribuição de *Salmonella* em carcaças de aves, nos numerosos sorotipos isolados e na presença de cepas resistentes a agentes antimicrobianos, conclui-se que é importante a realização de um controle higiênico-sanitário efetivo em todas as etapas da cadeia alimentar, desde a produção animal até o consumidor.

Deve-se identificar e controlar todos os pontos críticos durante as etapas de comercialização, conservação e preparo dos alimentos. Para tanto, é necessário implantação de programas de orientação de manipuladores de alimentos, particularmente no manuseio de produtos crus de origem animal como medida preventiva de riscos à saúde do consumidor.

TABELA 2

Resistência aos agentes antimicrobianos dos sorotipos de *Salmonella*

Marcas de resistência	Sorotipos - nº de cepas					
	<i>S. Agona</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Hadar</i>	<i>S. Mbandaka</i>	<i>S. Gloucester</i>	<i>S. enterica</i> subp <i>enterica</i> 4, 12:g,s,t:—
SF	1	0	0	1	0	1
FO	3	0	0	0	0	0
TT	0	0	1	0	0	0
CRX	0	0	0	0	3	0
SF,GN	0	1	0	0	0	0
CF,CFO,CRX,TT	0	1	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>

SF(sulfonamidas);  
FO(fosfomicina);  
TT( tetraciclina);

CRX(cefuroxima);  
GN(gentamicina);  
CF(cefalotina);

CFO(cefexetina).

PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; LIMA, S.I.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T. e GELLI, D.S.- *SALMONELLA*: Serotyping and antimicrobial susceptibility patterns of strains isolated from chicken carcasse samples commercialized in the São José do Rio Preto area - SP. *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, 58(1): 41-46,1999

ABSTRACT: From April 1995 to December 1996, 160 samples of chicken carcasses commercialized in the São José do Rio Preto area were studied. *Salmonella* serotyping and antimicrobial susceptibility patterns of all strains isolated were carried out. Eighty-seven (54,38%) out of 166 carcasses were *Salmonella*-positive with 18 serovars identified. The most frequent serovar was *Salmonella* Enteritidis (59,77%). Concerning to the antimicrobial susceptibility tests, 13,79% of the *Salmonella* isolates were resistant to the antimicrobial agents used. These findings show the high rate of chicken meat contaminated by *Salmonella*. Probably, this fact has facilitated the occurrence of many *S. Enteritidis* outbreaks in our area, taking into account the consumption of animal origin food, mainly from poultry, by a large number of people.

Keywords: chicken carcasses, *Salmonella*, serovars, antimicrobial susceptibility

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ARAUJO, E.; PACHECO, M.A.S.R.; BONI, R.F.; FONSECA, Y.S.K.; GELLI, D.S.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T. Surtos alimentares por *Salmonella enteritidis* associados ao consumo de alimentos à base de ovos, em Sorocaba, SP. *Higiene Alimentar*, 9(40):24-26,1995.
02. BAUER, A. W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J. C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45: 493-6, 1966.
03. BERCHIERI, A.; BARROW, P. A.; MURPHY, C. K. - Vertical Transmission of *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum* and *S. enteritidis* in commercial brown egg layers. *Salmonella and Salmonellosis*: 293-294, 1997.
04. BERCHIERI, JR., A.; BARROW, P. A. - Redution in Incidence of Experimental Fowl Typhoid by Incorporation of a Commercial Formic Acid Preparation (Bio - Add™) into Poultry Feed. *Poultry Science*, 75: 339-341, 1996.
05. BERCHIERI JR. A.; PAULILLO, A.C.; FERNANDES, S.A.; PESSOA, G.V.A.; ROSSI JR., OD.; IRINO, K.; ÁVILA, F.A.; CALZADA, C.T. - *Salmonella* em um abatedouro avícola. *Ars. Veterinaria*,3(1):81-87,1987.
06. FLOWERS, S.; D'AOUST, J.; ANDREWS, W. H.; BAILEY, J. S. - *Salmonella*. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F., ed. 3rd, c. 25, p. 388-404, 1992.
07. GONZALEZ, A.G.M.; NUNES, L.S.; AQUINO, M.H.C.; SANTOS, A.C.; PACHECO, A.P.G.; TIBANA, A. Frequência de *Salmonella* sp e *Campylobacter* sp em carcaças de frango comercializados na região do Grande Rio. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 19, Rio de Janeiro, 1997,p.271,AL-036.
08. IRINO, K.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; NEVES, B.C. & DIAS, A.M.G. - Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo state, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S.Paulo*. 38 (3) 193-06, 1996.
09. KAKU,M.; PERESI, J.T.M.; TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; BATISTA,A.B.; CASTA-NHEIRA, I.A.Z.; GARCIA, G.M.P.; IRINO, K.; GELLI, D.S. - Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 29(2):127-31,1995.
10. MARTINEZ, F.; BERCHIERI, JR., A. - The effect of disinfectants on *Salmonella enteritidis* (SE) and *Salmonella typhimurium* (STM). *Salmonella and Salmonellosis*: 493-497, 1997.
11. MIRANDA, J.B.N.; PESSOA, G.V.A.; IRINO, K. & CALZADA, C.T. - Ocorrência da *Salmonella* em farinhas utilizadas como matéria-prima na composição de rações animais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(2): 157-160. 1978.
12. MOTA, C.C.S.; VIEIRA, H.R.A.; PUZYNA, I.P.; KALACHE,J.; KONOLSAISEN,J.F.; CAMARGO, N.J. - Toxi-infecção alimentar por *Salmonella enteritidis*. Relato de um surto ocorrido em Curitiba-PR, Brasil/julho de 1981. *Higiene Alimentar*, 2:123-31,1983.
13. NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA,S.D.; RIBEIRO, A.R.; SANTOS, L.R.;CARDOSO, M.O.; PON-

- TES, A.P.; SILVA, A.B.; ROCHA, S.L.S. Identificação de sorovares de *Salmonella* em cortes e carcaças de frango. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 19, Rio de Janeiro, 1997, P.287, AI-098.
14. OMS . Lutte contre les salmonelloses: le role de l'hygiene applique aux animaux et aux produits. Séries des rapports techniques n° 774. OMS. Geneva, 1989.
15. PESSOA, G.V.A & SILVA, E.A.M. -Milieu pour la identification presomptive rapide des enterobactéries, des aeromonas et des vibrions. *Ann. Microbiol.* **125 A**:341-7,1974.
16. PISSANI, B.; ROCHA,M.M.M.; SIMÕES,M.; PRANDI, M.A.G.; BONWOART,P.A.G.; IRINO,K.; NEVES, B.C.; BEVILACQUA, A.R.P.A. - *Salmonella* Enteritidis: Elucidação de Surtos ocorridos na região de Campinas, de setembro de 1994 a junho de 1995. In :Congresso Brasileiro de Microbiologia, 18°, Santos,1995. *Anais*.p.80.
17. POPOFF,M.Y. & LE MINOR, L. - Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella* . Paris. Centre Collaborateur OMS de Reference et de Recherches pour les *Salmonella* , 1997.p. 11.
18. SILVA, E.N. - *Salmonella enteritidis* em Aves e Saúde Pública . *Higiene Alimentar*, **9** (37) : 9-13, 1995.
19. TAUNAY,A.E.; FERNANDES, S.A. ; TAVECHIO, A.T.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.& IRINO, K.-The role of Public Health Laboratory in the problem of Salmonellosis in São Paulo, Brazil. *Rev Inst.Med.trop,S.Paulo*, **38** (2): 119 -127, 1996.
20. TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A. ; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.& IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: Increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **38** (5) : 315-322, setembro/outubro, 1996.
21. VARNAM, A.H. & EVANS, M.G. - Foodborne Pathogens- An Illustrated Text. Wolfe Publishing Ltd. C.4, 1991.
22. VITAL BRAZIL, J.M.; COSTA, R.G.; REIS, E.M.F. & SOLARI, C.A. -Sorovares de *Salmonella* em matéria -prima e perfil de resistência aos antimicrobianos. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 19, Rio de Janeiro, 1997. P. 282, AL-080
23. WORLD HEALTH ORGANIZATION - *Guidelines on prevention and control of Salmonellosis*.Geneva, A.H.Linton, 1983.

Recebido para publicação em 27/04/98

OBSERVAÇÕES LABORATORIAIS SOBRE SURTOS ALIMENTARES DE *Salmonella* sp,  
OCORRIDOS NA GRANDE SÃO PAULO, NO PERÍODO DE 1994 A 1997.

Miyoko JAKABI\*  
Adriana Aparecida BUZZO\*  
Christiane Asturiano RISTORI\*  
Ana Terezinha TAVECHIO\*\*  
Harumi SAKUMA\*  
Ana Maria R. de PAULA\*  
Dilma Scala GELLI\*

RIALA 6/850

JAKABI, M.; BUZZO, A.A.; RISTORI, C.A.; TAVECHIO, A.T.; SAKUMA, H.; PAULA, A.M.R.; GELLI, D.S. - OBSERVAÇÕES LABORATORIAIS SOBRE SURTOS ALIMENTARES DE *Salmonella* sp, OCORRIDOS NA GRANDE SÃO PAULO, NO PERÍODO DE 1994 A 1997. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 47-51, 1999.

**RESUMO:** As Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETAs) causadas por salmonela são consideradas um dos mais importantes problemas de Saúde Pública, tanto nos países em desenvolvimento como em países desenvolvidos. Significativo aumento no número de surtos por *S. Enteritidis* tem sido observado na Grande São Paulo desde 1994. Foram relatados no período de outubro de 1994 a junho de 1997, 18 surtos de ETAs causadas por salmonelas envolvendo 23 alimentos, sendo que em 13 (72,2%) surtos foram identificados *Salmonella* Enteritidis. Os alimentos envolvidos foram predominantemente de origem animal, em especial ovos e seus derivados. O método analítico empregado foi uma modificação do descrito no "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods", APHA. A relevância e a gravidade deste microrganismo como agente de ETA é discutido neste trabalho.

**DESCRITORES:** Enfermidades Transmitidas por Alimentos, *Salmonella*, ovos e derivados.

## INTRODUÇÃO

As *Salmonella* sp são agentes frequentes de surtos de Enfermidades Transmitidas por Alimentos. É um microrganismo entérico, podendo estar presente no intestino de animais de sangue quente e, mais raramente, também nos de sangue frio. Em função da capacidade de disseminação, no meio ambiente, esta bactéria pode ser isolada de locais variados e diferentes (águas doces superficiais, costa marítima, carnes de animais, pescados, verduras, ovos, etc.) e conseqüentemente, de diver-

sas matérias primas alimentares. Pode, ainda, ser veiculada pelo próprio homem, neste caso na condição de portador assintomático<sup>12</sup>.

Já foram descritos mais de 2000 sorotipos de *Salmonella*. Porém, somente uma fração dos mesmos estão relacionados com doenças humanas. Em determinados períodos de tempo, considerando-se algumas décadas, ocorre a prevalência de 2-3 sorotipos nas infecções humanas<sup>9,12</sup>.

Apesar de não ser formadora de esporos e portanto apresentar termo sensibilidade de células bacterianas

\* Seção de Microbiologia Alimentar – Divisão de Bromatologia e Química – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo.

\*\* Setor de Enterobactérias – Divisão de Biologia Médica – Instituto Adolfo Lutz - São Paulo.

vegetativas, além de outras características como não sobrevivência em pH ácidos, a ocorrência de surtos por *Salmonella* sp é freqüente. As causas são várias, em especial a já citada capacidade de disseminação, relacionada com possibilidades de contaminação cruzada em ambiente de preparo de alimentos, com conseqüente multiplicação, associada ao tempo decorrido entre preparo e consumo de alimentos<sup>12</sup>.

Desde a década de 80, o sorotipo Enteritidis tem sido considerado prevalente e associado ao consumo de aves e ovos. Este sorotipo consegue se manter em ovidutos de matrizes, o que leva à contaminação interna das gemas de ovos. Ainda, a sua recontaminação em alimentos já cozidos também está associada à ocorrência de surtos alimentares, tanto no Brasil como nos demais países.

Levantamentos realizados nos Estados Unidos, onde os surtos são notificados de forma mais sistematizada, revelam que, no período de 1988 a 1992, ocorreram 549 episódios por *Salmonella*, 69% do total de notificações. Destes, 60% foram pela *S. Enteritidis*, o que demonstra a importância deste sorotipo no período considerado. Outro dado importante, é a capacidade deste sorotipo causar infecções extra-intestinais, inclusive com casos fatais<sup>3</sup>. Nos países da Europa, os dados existentes revelam situação semelhante à descrita para os Estados Unidos<sup>3,4,5,12</sup>. Apesar da existência de sistema para notificação de doenças alimentares, nos países citados incluindo o Japão e o Canadá, reconhece-se que os dados existentes não retratam a totalidade de surtos por esta etiologia<sup>8</sup>. No Brasil, onde tal sistema é incipiente, com exceção do Estado do Paraná, os relatos são ainda mais escassos<sup>2,7</sup>.

Na legislação brasileira, os limites constantes para esta bactéria é de ausência em 25g. Entretanto, existe uma quantidade necessária para a ocorrência da doença humana. Esta quantidade, ou dose infectante, pode variar em função do sorotipo e da afinidade dos mesmos a determinadas espécies animais; por exemplo, menos de 10 células da *S. Typhi*, exclusivamente humana, é suficiente para desencadear doença no homem, enquanto são necessárias 10<sup>11</sup>/g da *S. Pullorum*, adaptada às aves, para enfermar o homem<sup>12</sup>. Para a elucidação de surtos por esta etiologia, não é suficiente verificar presença em 25g, assim como não são adequados resultados de presença de *Salmonella* em 25g. Entretanto, em algumas situações, é possível realizar a análise em alíquotas determinadas, quando se trata de amostras semi-elaboradas, não prontas para consumo, que terão resultados indicativos da presença do agente, e em ambiente hospitalares, para os quais, a presença sem a quantificação pode ser elucidativa de surtos, uma vez que se trata de consumidores sensíveis, seja por faixa etária extrema (bebes e idosos) ou por doenças concorrentes. No caso de análise de

águas, a alíquota deve ser maior, considerando o tempo de incubação da doença (acima de 6 horas) e a diluição "natural" dos reservatórios e poços.

O presente trabalho tem por objetivo o relato de observações laboratoriais obtidos da análise de alimentos envolvidos em surtos alimentares, efetivamente consumidos, ou semi elaborados e de amostras da mesma partida usada para o preparo de alimentos (ovos/maionese ou *mousse*), de surtos ocorridos por esta etiologia, no período de outubro de 1994 a junho de 1997, na cidade de São Paulo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Das amostras enviadas para elucidação de surtos de Enfermidades Transmitidas por Alimentos, no período de outubro de 1994 a junho de 1997, 23 foram positivas para *Salmonella*, assim distribuídas: 5 maioneses; 2 bolos; 2 *mousses*; 4 alimentos à base de carnes (destes, 1 coxinha ainda por fritar, 1 coxa de frango frita e 1 espeto de almôndega cru); 3 de águas; 1 de ovo liofilizado e 1 de ovos inteiros, da mesma partida dos usados para o preparo de alimento; 2 pratos à base de cereais (arroz cozido e salada de lentilha); 2 de leite reconstituído (mameadeiras) e 1 de alimento à base de legumes (batata cozida).

As amostras se referem a 18 surtos, sendo 7 em 1994 (de 2 dentre os 7, foram enviadas 2 amostras/surto); 5 em 1995 (de 1, foram entregues 3 amostras); 2 em 1996 e 3 de 1997 (de 1, foram enviadas 2 amostras).

As solicitações de análise continham poucas informações sobre número de expostos e de afetados, período de incubação e sintomas e sinais clínicos prevalentes. Dentre os acometidos; entretanto, todas as solicitações indicavam diarreia e febre, o que permitiu dirigir a análise para este agente etiológico.

Quando da análise de amostra de alimentos efetivamente consumidos, a metodologia analítica foi conforme descrito no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (APHA)<sup>6</sup>, modificada no que se refere ao caldo de pré-enriquecimento (Água Peptonada a 1% - APT-1%), às diluições seriadas, quando aplicável, em APT-1% (até a diluição de 10<sup>-7</sup>), à utilização dos caldos de enriquecimento seletivo (Rappaport-Vassiliadis modificado e caldo selenito-cistina), incubados a 42° C por 24, 48hs e até 5 dias e plaqueamento nos meios *Salmonella-Shigella* (SS), Verde Brilhante (BG) e Sulfito de Bismuto ágar (BSA). O isolamento das colônias suspeitas foi feito em meio Instituto Adolfo Lutz (IAL), para a identificação presumtiva de enterobactérias. As colônias que apresentaram

reação característica de Salmonelas, neste meio, foram testadas frente aos antisoros polivalentes "O" e "H". Nas amostras cruas e em uma amostra de arroz cozido não foram realizadas as etapas de diluições seriadas. Na amostra de água um volume de 1000 ml foi filtrado em membrana de 0,45 µm de diâmetro. Após a filtragem, a membrana foi colocada em 225ml de APT-1%. Uma amostra composta de 6 ovos inteiros foi analisada conforme segue: os ovos foram quebrados em capela de fluxo laminar, separando-se as gemas e desprezando-se cascas e claras. As gemas foram homogeneizadas e acrescentou-se APT-1%, v/v. Após o enriquecimento não seletivo (18-24h a 35°C), procedeu-se às etapas analíticas conforme já descrito, tanto para as membranas filtrantes como para as gemas.

Uma vez caracterizada como *Salmonella*, as cepas foram enviadas para o Setor de Enterobactérias da Seção de Bacteriologia Médica do I. Adolfo Lutz Central, onde foram sorotipadas segundo metodologia descrita por Popoff & Le Minor<sup>9</sup>.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos, anualmente, por alimento, sorotipo e alíquotas positivas, estão expressos nas Tabelas 1 (outubro a dezembro de 1994), Tabela 2 (1995), Tabela 3 (1996) e Tabela 4 (Jan. a Jun. 1997).

Os dados constantes nas solicitações de análise foram: 10, sem referência ou histórico de expostos/afetados; 1, relatando 20 afetados; 1, assinalando 28 hospitalizados e 1 caso fatal (1994); 1, com 100 afetados por consumo de ovo liofilizado; 1, com 100 afetados por bolo; 1, com 18 afetados por maionese e 1 caso fatal (1995); 1 com cerca de 500 afetados por consumo de salada de lentilha (1996); 1, com cerca de 30 afetados por consumo de arroz cozido; 1, relatando 223 expostos, dentre os quais 10 afetados por consumo de coxa de frango (1997).

Nos surtos com relato de casos fatais, os alimentos envolvidos, o sorotipo e as maiores diluições positivas são: em 1994, uma amostra de carne assada com *S. Enteritidis* até a diluição 10<sup>-4</sup> e uma maionese, do mesmo surto, também com até a diluição 10<sup>-4</sup> de *S. Enteritidis*; em 1995, presença de *S. Enteritidis* até a diluição 10<sup>-5</sup> em maionese.

Com relação aos resultados de mais de 1 amostra relacionada com o mesmo surto, observa-se, dos surtos de 1994, a presença de *S. Infantis* em batata cozida (até 10<sup>-3</sup>) e maionese (até 10<sup>-4</sup>) e em carne assada e maionese, ambas com até 10<sup>-4</sup> *S. Enteritidis*/g; dos surtos de 1995, gemas de ovos crus (presença em 25g), *mousse* de chocolate (até 10<sup>-7</sup>) e *mousse* de limão (até 10<sup>-6</sup>) também com

positividade para a *S. Enteritidis* e, a partir de materiais de outro surto, presença em 5ml de *S. enterica* subespécie *Arizonae* 61:-:1,5 de 2 fórmulas diferentes de mameiras (leite reconstituído).

TABELA 1

Sorotipos e quantificação de salmonelas encontradas nos diferentes tipos de alimentos envolvidos nos surtos ocorridos na Grande São Paulo, no ano de 1994.

TIPO DE ALIMENTO	SOROTIPO	QUANTIFICAÇÃO
Água	<i>S. I</i> 6,7: e,h:-	pres. em 1000 ml
Água	<i>S. IIIb</i> 50: r: z	pres. em 1000 ml
Água	<i>S. Panama</i>	pres. em 1000 ml
Salgadinho	<i>S. Enteritidis</i>	pres. em 25 g
Maionese	<i>S. Enteritidis</i>	até dil. 10 <sup>-4</sup>
Maionese	<i>S. Infantis</i>	até dil. 10 <sup>-4</sup>
Batata cozida	<i>S. Infantis</i>	até dil. 10 <sup>-3</sup>
Maionese	<i>S. Enteritidis</i>	pres. em 25 g
Carne assada	<i>S. Enteritidis</i>	pres. em 25 g

TABELA 2

Sorotipos e quantificação de salmonelas encontradas nos diferentes tipos de alimentos envolvidos nos surtos ocorridos na Grande São Paulo, no ano de 1995.

TIPO DE ALIMENTO	SOROTIPO	QUANTIFICAÇÃO
Ovos	<i>S. Enteritidis</i>	pres. em 6 unidades
<i>Mousse</i> de chocolate	<i>S. Enteritidis</i>	até dil. 10 <sup>-7</sup>
<i>Mousse</i> de limão	<i>S. Enteritidis</i>	até dil. 10 <sup>-6</sup>
Espeto de almôndega	<i>S. Enteritidis</i>	pres. em 25 g
Ovo liofilizado	<i>S. Enteritidis</i>	até dil. 10 <sup>-7</sup>
Bolo	<i>S. Enteritidis</i>	até dil. 10 <sup>-5</sup>
Maionese	<i>S. Enteritidis</i>	até dil. 10 <sup>-5</sup>
Maionese	<i>S. Enteritidis</i>	até dil. 10 <sup>-7</sup>

TABELA 3

Sorotipos e quantificação de salmonelas encontradas nos diferentes tipos de alimentos envolvidos nos surtos ocorridos na Grande São Paulo, no ano de 1996.

TIPO DE ALIMENTO	SOROTIPO	QUANTIFICAÇÃO
Lentilha	<i>S. Enteritidis</i>	até dil. 10 <sup>-4</sup>
Bolo	<i>S. Enteritidis</i>	até dil. 10 <sup>-3</sup>

TABELA 4

Sorotipos e quantificação de salmonelas encontradas nos diferentes tipos de alimentos envolvidos nos surtos ocorridos na Grande São Paulo, no ano de 1997.

TIPO DE ALIMENTO	SOROTIPO	QUANTIFICAÇÃO
Coxa de frango	<i>S. Enteritidis</i>	pres. em 25 g
Arroz cozido	<i>S. Enteritidis</i>	pres. em 25 g
Leite reconstituído	<i>S. enterica</i> , subespécie <i>Arizonae</i> 61:-:1,5	pres. em 5 ml
Leite reconstituído	<i>S. enterica</i> , subespécie <i>Arizonae</i> 61:-:1,5	pres. em 5 ml

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, no presente trabalho, estão de acordo com os dados da literatura específica sobre a importância do gênero *Salmonella*, nas Enfermidades Transmitidas por Alimentos<sup>3,8,11,12</sup> e a prevalência da *S. Enteritidis* internacionalmente ou na situação endêmica atual<sup>1,2,4,5,7,10</sup>. É importante assinalar que a notificação de surtos por consumo de alimentos é incipiente em nosso meio. Desta forma a real ocorrência desta doença não pode ser fundamentada apenas nestes dados (de 23 cepas isoladas 16 pertencendo a este sorotipo).

Embora por análises laboratoriais não seja possível a completa explicação das causas que favoreceram os surtos, é interessante observar que amostras diferentes, relacionadas com o mesmo surto, apresentam o mesmo sorotipo, permitindo concluir que a contaminação cruzada não é rara, no preparo final de alimentos<sup>7,12</sup>.

Considerando o número de células viáveis obtidas dos alimentos prontos para consumo, exceção das amostras de água, mamadeiras e arroz cozido, nas demais foram encontrados níveis a partir da diluição 10<sup>-3</sup>, até a diluição 10<sup>-7</sup>, tanto em surtos por sorotipo *Infantis* como *S. Enteritidis*. A indicação de hospitalizações e de casos fatais obtidos, se referem a surtos pela *S. Enteritidis*. Em ambos os casos fatais, mais do que um alimento consumido estava envolvido com a veiculação deste agente, o que pode ter potencializado o número necessário para causar a doença e sua conseqüente fatalidade.

No que se refere à amostra de ovo liofilizado, é possível concluir que os mesmos foram preparados a partir de ovos contendo a *Salmonella*, atingindo números altos antes da liofilização. Não havia informação sobre pasteurização prévia; porém, caso tenha sido realizada, o provável é que os ovos se recontaminaram e foram mantidos em temperatura e condições compatíveis com a multiplicação deste agente. Em qualquer das situações os resultados obtidos são preocupantes, revelando descuido e despreparo da indústria liofilizadora.

Ainda, observa-se que o consumo de alimentos à base de ovos contaminados e de aves pode ser considerado como veiculador prevalente de ETAs. Dos surtos relatados, 7 estão relacionados com o consumo destes alimentos; no caso de 1 dos bolos (1995), a cobertura era de clara crua batida em neve. Este achado confirma os dados de literatura<sup>2,3,4,5,12</sup>.

O presente trabalho permite concluir que:

- as atividades de elucidação de agentes de ETAs devem ser sistematizadas, por notificação obrigatória destes eventos;

- as informações de expostos/afetados, período de incubação e sinais e sintomas prevalentes são de importância para que o laboratório possa conduzir as determinações analíticas de forma mais específica;

- embora seja possível a análise de matérias primas e de produtos semi-acabados, como indicativas da presença do agente, o diagnóstico deve ter por base os alimentos efetivamente consumidos pelos afetados;

- há necessidade de programas que possibilitem informações sobre higiene de alimentos e aplicação dos princípios do sistema de Análise de Perigos, Pontos Críticos de Controle (HACCP), tanto para a preparação final de alimentos, como para as indústrias.

- os laboratórios devem realizar quantificações a partir de amostras relacionadas com ETAs;

- a sorotipagem é de fundamental importância para o estudo epidemiológico e de aspectos de manipulação/preparo higiênico de alimentos.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Seção de Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz que todos esses anos vem con-

tribuindo com a preparação dos meios utilizados na realização desse levantamento.

RIALA 6/850

JAKABI, M.; BUZZO, A.A.; RISTORI, C.A.; TAVECHIO, A.T.; SAKUMA, H.; PAULA, A.M.R.; GELLI, D.S. - Laboratorial observation about foodborne Salmonellosis outbreaks in Great São Paulo city, from 1994 to 1997. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 47-51, 1999.

**ABSTRACT:** Foodborne diseases by *Salmonella* sp are one of the most important problems in Public Health. Since 1994 a significant increase of *S. Enteritidis* outbreaks have been notified in the Great São Paulo city. From October 1994 to June 1997, 18 foodborne disease outbreaks due to *Salmonella* were reported, involving 23 different kinds of foods. *S. Enteritidis* was responsible for 13 (72,2%) of the outbreaks.

**Key words:** Foodborne diseases, *Salmonella* sp, eggs and sub-products.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTEKRUSE, S.F.; COHEN, M.L. & SWERDLOW, D.L. Emerging Foodborne Diseases. **Emerg. Infect. Dis.** 3(3): 285-293.1997.
2. ARAÚJO, E.; PACHECO, M.A.S.R.; BONI, R.F.; FONSECA, Y.S.K.; GELLI, D.S.; FERNANDES, S.A. & TAVECHIO, A.T. Surtos alimentares por *Salmonella* Enteritidis associados ao consumo de alimentos à base de ovos, em Sorocaba, S.P. **Higiene Alimentar**, 9(40): 24-26, 1995.
3. BEAN, N.H.; GOULDING, J.S.; DANIELS, M.T. & ANGULO, F.J. Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1988-1992 (-review). **J. Food Prot.** 60(10): 1265-1286. 1997.
4. CAFFER, M.I. & EIGUER, T. *Salmonella* Enteritidis in Argentina. **Int. J. Food Microbiol.**, 21: 15-19.1994.
5. FANTASIA, M.R. & FILETICI, E. *Salmonella* Enteritidis in Italia. **Int. J. Food Microbiol.**, 21: 7-13.1994.
6. FLOWERS, R.S.; D'AOUST, J.Y.; ANDREWS, W.H. & BAILEY, J.S. "*Salmonella*". In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 3<sup>rd</sup> ed., Washington, D.C., Vanderzant, C. & Splittstoesser, D.F., c.25, p.371- 422, 1992.
7. KAKU, M.; PARESI, J.T.; TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; BATISTA, A.B.; CASTANHEIRA, I.A.Z.; GARCIA, G.M.P.; IRINO, K. & GELLI, D.S. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no nordeste do estado de S. Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 29 (2): 127-131. 1995.
8. NOTERMANS, S. & BORGENDORFF, M. A Global Perspective of Foodborne Disease. **J. Food Prot.**, 60(11): 1395-1399. 1997.
9. POPOFF, M.Y. & MINOR L. Formule antigeniques des sérovars de *Salmonella*. Paris. Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherches pour les *Salmonella*, Institut Pasteur, p.151,1997.
10. RIDZON, R.; KLUDT, P.; PEPPE, J.; SHARIFZADEH, K. & LETT, S. Two outbreaks of *Salmonella* Enteritidis associated with Monte Cristo Sandwiches. **J. Food Prot.** 60(12): 1568-1570. 1997.
11. TAUXE, R.V. Emerging Foodborne Diseases: An Evolving Public Health Challenge. **Emerg. Infect. Dis.** 3(4): 425-434. 1997.
12. VARNAM, A.H. & EVANS, M. G. *Foodborne Pathogens*. Wolfe Publishing Ltd. 1991. c.4, p.51-85.

Recebido para publicação em 29/05/98



A SURVEY OF THE OCCURRENCE OF AFLATOXINS IN GROUNDNUTS (PEANUTS)  
AND GROUNDNUT PRODUCTS IN SÃO PAULO STATE /BRAZIL IN 1994\*

Myrna SABINO\*\*  
Emiko Ikejiri INOMATA\*\*  
Leda Conceição Antonia LAMARDO\*\*  
Thaís Valéria MILANEZ\*\*  
Sandra Aparecida NAVAS\*\*  
Maria Ângela Pompeu ZORZETTO\*\*

RIALA 6/851

SABINO, M; INOMATA, E.I.; LAMARDO, L.C.A.; MILANEZ, T.V.; NAVAS, S.A. & ZORZETTO, M.A.P.- A survey of the occurrence of aflatoxins in groundnuts (peanuts) and groundnut products in São Paulo State/ Brazil in 1994. *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, 58 (1): 53-57, 1999.

**ABSTRACT:** Survey results of 321 samples of groundnuts (peanuts) and groundnut products obtained from the Inspection Service of the Sanitary Guidance of the Health Secretary of São Paulo (totaling 321 samples) collected in an one-year period (1994) showed levels of aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> above 30.0 µg.kg<sup>-1</sup> for 36% of the samples. All samples were analyzed by thin-layer chromatography and results quantified by visual analysis. The aflatoxins concentration of the samples varied from 5.0 to 2440.0 µg.kg<sup>-1</sup> and the 90<sup>th</sup> percentil was 489.0 µg.kg<sup>-1</sup>. A total of 116 samples (36%) showed concentrations greater than permitted by Brazilian Legislation which, for aflatoxins B<sub>1</sub> + G<sub>1</sub>, is 30.0 µg.kg<sup>-1</sup> for food (domestic consumption). The limit of determination of the method was 5.0 µg.kg<sup>-1</sup>.

This survey reconfirmed the extent and level of occurrence of aflatoxins in groundnuts and groundnut products in São Paulo and also showed that the mycotoxin problem still exists, mainly due to conditions of temperature and humidity prevalent in the State of São Paulo that are favorable to the growth of toxigenic moulds.

**DESCRIPTORS:** aflatoxins, peanuts, peanuts products, thin-layer chromatography.

## INTRODUCTION

Aflatoxins are a group of secondary metabolites produced by three species, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*<sup>7</sup>. They are toxic to different animal species, and aflatoxin B<sub>1</sub> is the most toxic of this group. It is hepatotoxic and was classified as class I human carcinogen<sup>8</sup>. Aflatoxin production is favoured by temperature of 25 to 30° C, high humidity and high water activity (0.86-0.96). If the

moisture content of the commodity goes above a certain level aflatoxin formation may occur<sup>3,6</sup>.

Aflatoxin contamination is a large problem in groundnuts and groundnut products in Brazil, a tropical country where mould growth is favored by the conditions of high humidity and temperature, cultivation, harvest, transportation and storage<sup>9</sup>.

Most Brazilian groundnut are grown in São Paulo State. There are yearly two crops of groundnuts, the first one, the rain crop, is harvested from January to March during the summer. The second one is smaller and it is cal-

\* Realizado na Seção de Química Biológica

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz

led the dry crop, it goes from May to June. Temperatures and humidities are high in the west of São Paulo State which is the main groundnut producing area. Table 1 shows its area and production of groundnut first crop (rain crop - the main one). Measures needed to improve the situation are often difficult to introduce, because an efficient extension service is still being developed.

TABLE 1

Area and production of groundnut first harvest, São Paulo State, outstanding Regional Agriculture Divisions (RADs). Harvest 1993/94 and 1994/95.

RADS	AREA(ha)		VARIATION%	PRODUCTION (MI BAG 25 Kg)		
	1994	1995		1994	1995	VARIATION%
Marília	9,000	10,325	14.7	660	365	-44.7
Ribeirão Preto	21,630	26,250	21.4	2,200	2,630	19.5
São Carlos	6,970	10,300	47.8	560	815	45.5
Vale do Paranapanema	3,345	3,652	9.2	185	270	45.9
Presidente Prudente	3,695	3,520	-4.7	300	260	-13.3
Others	8,460	7,583	-10.4	565	590	4.4
State	53,100	61,630	16.1	4,470	4,930	10.3

Source: Instituto de Economia Agrícola (IEA) and Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI)

Groundnut production in Brazil was 956,000 tons in 1972, an increase of 100% over that in 1960. However investments in soybean cultivation in the early 1970s caused groundnut production to decrease to levels equal to or less than in 1958. Groundnut production has decreased so much that it is no longer competitive with soybean as an oil crop<sup>4,5</sup> (Table 1) Groundnut cultivation is mainly done by small farmers using rudimentary systems which are vulnerable to mould infection, and aflatoxin production.

Aflatoxin contamination is a public health concern, so the Instituto Adolfo Lutz monitorizes the incidence of these substances in groundnuts and groundnut products periodically. This paper is a complement to others surveys done before<sup>2,15,16</sup> in order to know the real condition of these products concerning aflatoxins.

## MATERIAL AND METHODS

### Sample collection

Representative 1 kg were taken from 321 samples of groundnuts and groundnut products from different markets and milling factories located in São Paulo State by the Inspection Service of the Sanitary Guidance of Health Secretary of São Paulo State, from January to December, 1994.

### Extraction

Aflatoxins were determined using the TLC method of Soares & Rodriguez-Amaya<sup>18</sup> as follows: the finely ground sub sample (50g) was blended with a mixture of 270 mL methanol and 30 mL of 4% KCl. After blending for 5 min. the mixture was filtered through fluted paper. Then, 150 mL of the extract was cleaned up by adding 10% CuSO<sub>4</sub> plus Hyflo Super Cel, stirred with a glass rod and filtered through fluted paper. A 150 mL volume of this filtrate was extracted with CHCl<sub>3</sub> (10mL x 2). This combined chloroform extract was evaporated to near dryness in a steam bath, transferred quantitatively with CHCl<sub>3</sub> to a sample vial (ca 1-2 g) and evaporated to dryness in a steam bath under a stream of nitrogen.

### TLC determination

The amount of 5.0 µl of the chloroform extract was spotted on the same plate with the standards at different concentrations. The mobile phase used was toluene: ethyl acetate:formic acid 90% (50 + 40 + 10) v/v. The developed plate was dried and then observed under long wave ultraviolet light (366 nm). The intensities of the fluorescent spots were compared with the aflatoxin standards by visual observation. The detection limit of this method was 2.5 µg kg<sup>-1</sup>. The identity of aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> were confirmed by the formation of the characteristic derivatives after reaction with trifluoroacetic acid.<sup>13</sup> The determination limit of the method was 5.0 µg.kg<sup>-1</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

A summary of the results from the survey of aflatoxin contamination is shown in Table 2. The natural incidence of aflatoxins in these samples was high. About 36% (116) of the samples studied showed contamination exceeding that tolerated by Brazilian legislation, a maximum level of 30.0 µg. kg<sup>-1</sup> for aflatoxin B<sub>1</sub> plus aflatoxin G<sub>1</sub><sup>1</sup>. 44% (142) of the samples showed levels of aflatoxins (B<sub>1</sub> + G<sub>1</sub>) that varied from 5.0 to 2440.0 µg.kg<sup>-1</sup>. The amount of aflatoxins in most of the positive samples (42/142) ranged from 400 to 2440 µg.kg<sup>-1</sup>. However, 12 samples contained more than 1000 µg aflatoxins kg<sup>-1</sup> with a 90<sup>th</sup> percentile value of 489 µg.kg<sup>-1</sup>.

TABLE 2

Incidence of AFB<sub>1</sub> and AFG<sub>1</sub> in groundnuts and groundnuts products from several regions in São Paulo State

TOTAL SAMPLES	N <sup>o</sup> SAMPLES >5µg.kg <sup>-1</sup>	N <sup>o</sup> SAMPLES 5-30µg.kg <sup>-1</sup>	N <sup>o</sup> SAMPLES >30µg.kg <sup>-1</sup>	AVERAGE OF POSITIVE SAMPLES (µg.kg <sup>-1</sup> )	90 <sup>th</sup> % (µg.kg <sup>-1</sup> )	RANGE MIN-MAX (µg.kg <sup>-1</sup> )
321	142 (44.2%)	26 (8.1%)	116 (36.1%)	305	489	5-2440

There have been several previous studies of aflatoxin contamination of peanuts in Brazil. Sabino<sup>15</sup> analysed 300 samples of many products including groundnuts and groundnut products and observed that, in the period 1971-1975, the levels ranged from not detected to 7,800 µg.kg<sup>-1</sup>, with a mean of 1,131 µg.kg<sup>-1</sup>. 37% of the samples exceeded the limit established by Brazilian legislation. Scussell & Rodriguez-Amaya<sup>17</sup> analysed samples of groundnuts and groundnut products purchased at random in different supermarkets and stores in Campinas (São Paulo State) in 1980-1982. Of the 241 samples analysed, 128 gave positive results, of which 92 exceeded the 30.0 µg.kg<sup>-1</sup> limit. The highest levels encountered for aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> were 1,282 and 476.0 µg.kg<sup>-1</sup> for "paçoca" (candy made with peanuts), 1,904 and 69.0 µg.kg<sup>-1</sup> for raw shelled peanuts and 1,026 and 366 µg.kg<sup>-1</sup> for soybeanut. Sabino et al.<sup>16</sup> observed aflatoxin contamination in 1,374 samples of groundnut and groundnut products from São Paulo during the period 1980-1987. The incidence rate and the aflatoxin levels varied from year to year with no defined pattern. The highest mean level was obtained in 1983 when 49% of 198 samples were positive with a mean level of 333 µg.kg<sup>-1</sup>; the range was 8-864 µg.kg<sup>-1</sup>. The most contaminated sample, belonging to the 1985 lot, had 6,561 µg.kg<sup>-1</sup>. During this year, aflatoxins were detected in 28% of 275 samples, the mean being 91 µg.kg<sup>-1</sup>. The highest incidence occurred in 1982 when 71% of 132 samples were positive; the range was 8 - 2,500 µg.kg<sup>-1</sup>. Ricciardi and Ferreira<sup>14</sup> analysed 49 samples of groundnuts and 38 of groundnut candies for aflatoxins, collected from the Ribeirão Preto region - São Paulo. Aflatoxin B<sub>1</sub> was detected

in 67.2% of the samples, 24.5% being above and 32.7% below the regulatory limit. All these studies show the continuing problem of aflatoxin contamination in groundnuts, even when the contamination occurred so high as years ago<sup>2,10,11,12,15,16,17,18</sup>. But the problem still exists. In years when rain is copious during harvesting, 40-80% of the crop may be contaminated with aflatoxins<sup>12</sup>. The products offered for export have been rejected by importing countries because of this contamination. It appears that environmental conditions in Brazil favor aflatoxin contamination of stored grains. For this reason there must be strict control in the handling of unprocessed peanut in order to avoid its contamination and the subsequent danger to the consumers.

#### CONCLUSIONS

This survey shows that aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> are present in about 44% of the samples analysed and 36% of the total exceeded the maximum tolerable limits established by the present Brazilian regulation. It reconfirms the extent and the level of occurrence of aflatoxins in groundnuts and groundnut products in Brazil. It also showed that the mycotoxin problem still exists, some years more pronoucially, others years not so much. It is necessary to motivate agriculture technicians to educate farmers on the prevention of this kind of contaminant and also encourage good agriculture practices to minimize field, harvest and post-harvest groundnut contamination. The authorities should be aware about their responsibilities and act concerning the marketing and utilization of this commodity.

SABINO, M; INOMATA, E.I.; LAMARDO, L.C.A.; MILANEZ, T.V.; NAVAS, S.A. & ZORZETTO, M.A.P.- Dados de ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim no Estado de São Paulo/Brasil em 1994. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 49-53, 1999.

RESUMO: Foram analisadas 321 amostras de amendoim e produtos de amendoim, comercializados no Estado de São Paulo, em 1994 e colhidos pela Vigilância Sanitária da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo quanto ao teor de aflatoxinas. Um total de 116 amostras (36%) mostraram níveis de aflatoxinas B<sub>1</sub> + G<sub>1</sub> acima do limite permitido pela legislação brasileira (30 µg.kg<sup>-1</sup>). As amostras foram analisadas por cromatografia em camada delgada e o resultado, quantificado visualmente. As concentrações variaram de 5 a 2.440 µg.kg<sup>-1</sup> e o 90<sup>th</sup> percentil foi de 489 µg.kg<sup>-1</sup>. O limite de quantificação do método é de 5 µg.kg<sup>-1</sup>. Os dados confirmam a extensão e o nível de ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim em São Paulo e também mostra que este problema ainda existe, principalmente em condições de temperatura e umidade alta, clima predominante no Estado de São Paulo favorável ao crescimento de fungos toxigênicos.

DESCRITORES: aflatoxinas, amendoim, produtos de amendoim, cromatografia em camada delgada.

#### REFERENCES

1. BRASIL, Leis, decretos, etc.- Resolução nº 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Diário Oficial, Brasília, 19 de janeiro 1977. Sec. I pt. I, p.710.
2. BRIGIDO, B.M.; BADOLATO, M.I.C. & FREITAS, V.P.S.- Contaminação de amendoim e seus produtos comercializados na região de Campinas-SP, por aflatoxinas durante o ano de 1994. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(2):85-90, 1995.
3. BULLERMAN, L.B.; SCHROEDER, L.L. and PARK, K-Y - Formation and control of mycotoxins in food. *Journal of Food Protection*, 47(8): 637-646, 1984.
4. CACEX, 1984: Informação semanal nº 909 (Agosto).
5. CACEX, 1985: Informação semanal nº 960 (Agosto).
6. DIENER, U.L. and DAVIS, N.D.- Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 44: 259-263, 1967.
7. FRISVAD, J.C. and THRANE, U.- Mycotoxin production by food-borne fungi. In: *Introduction to Food-Borne Fungi*, edited by R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad and O. Filtenborg (C.B.S.) 1995, p. 251-260.
8. IARC.- Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Volume 56 (Lyon: International Agency for Research on Cancer), 1993, p. 245-395.
9. MILLER, J.D.- Fungi and mycotoxin in grain: implications for stored product research. *Journal of stored Product Research*, 31(1): 1-16, 1995.
10. OLIVEIRA, V.; MESQUITA, A.J.; SERAFINI, A.B.; RIBEIRO, J.L.; SILVA, M.R.R. - Ocorrência de aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> em amendoim comercializado em Goiânia - GO, Brasil. *Revista de Microbiologia*. 22: 319-322, 1991.
11. PRADO, G. - Incidência de aflatoxina B<sub>1</sub> em alimentos. *Revista. Farmacia Bioquímica*. 5: 147-157, 1983.
12. PRADO, G.; MATTOS, S.V.M.; PEREIRA, E.C. - Níveis de aflatoxinas em alguns alimentos consumidos em Belo Horizonte no período de 1983 a 1988. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 9: 138-147, 1989.
13. PRZYBYLSKI, W.- Formation of aflatoxin derivatives on thin-layer chromatographic plates. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 58: 163-164, 1975.
14. RICCIARDI, J.A. and FERREIRA, J.F.- Dosagem de aflatoxina B<sub>1</sub> em amendoim e em doces de amendoim. *Revista Brasileira de Farmácia*, 67: 111-117, 1986.
15. SABINO, M.- Variações de níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 4(2): 153-158, 1980.

16. SABINO, M., ZORZETTO, M.A.P., PEDROSO, M.O., MILANEZ, T.V.- Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de São Paulo, no período de 1980 a 1987. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, **49**: 41-44, 1989.
17. SCUSSEL, V.M. and RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.- Teores de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados em Campinas em 1980-82, *Boletim SBCTA*, **19**: 109-119, 1985.
18. SOARES, L.V. and RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.- Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using a multitoxin thin-layer chromatographic method. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **72**(1):22-26, 1989.

Recebido para publicação em 04/06/1998.

ATIVIDADE DA VIOLACEÍNA *IN VITRO* SOBRE  
*O Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>RA

Ana Olivia de SOUZA\*  
Dalva Cristina Girello AILY\*\*  
Daisy Nakamura SATO \*\*\*  
Nelson DURÁN\*

RIALA 6/852

SOUZA, A. O. ; AILY, D.C.G.; SATO, D.N. & DURAN,N. - Atividade da Violaceína *In Vitro* sobre *O Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 59-62, 1999.

**RESUMO:** Este estudo relata a atividade antimicobacteriana da violaceína, 3-[1,2-Dihidro-5 - (5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3 ilideno] 1,3-dihidro-2H-indol-2-ona sobre a cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Ra. A violaceína apresentou ação antimicobacteriana *in vitro* com concentração inibitória mínima (CIM) de 64 µg/mL e concentração bactericida mínima (CBM) de 128 µg/mL. Estes valores são comparáveis aos descritos na literatura para a pirazinamida.

**DESCRITORES:** Violaceína, tuberculose, antimicobacteriano, *Chromobacterium violaceum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *in vitro*.

### INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a tuberculose é responsável por mais de 3 milhões de mortes por ano<sup>12,13</sup> e o aumento da incidência está relacionado com casos de AIDS em muitos países<sup>16</sup>. A quimioterapia com drogas antituberculose se iniciou em 1944 com a estreptomina<sup>24</sup> e, em 1946, já havia o uso de uma associação terapêutica visando a cura da tuberculose causada por microrganismos resistentes. Além do aumento no número de casos de tuberculose<sup>3</sup> há um aumento da proporção de microrganismos resistentes<sup>4</sup> o que dificulta o tratamento da doença. Isto tem levado à contínua pesquisa por uma quimioterapia alternativa por meio da identificação de novas drogas que sejam mais eficazes e menos tóxicas que as correntemente em uso<sup>1,21</sup>.

A *Chromobacterium violaceum* produz vários compostos que apresentam atividades biológicas. Dentre eles

a aerocianidina e a aerocavina possuem atividade antibiótica<sup>18,20</sup> e o depsipeptídeo bicíclico - FR901228, caracteriza-se por sua ação antitumoral<sup>23</sup>. Além destes compostos, há a violaceína, 3-[1,2-Dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (figura 1), um pigmento violeta, também ex-

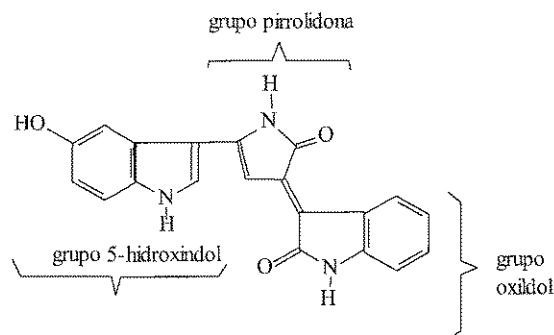


FIGURA 1 — Estrutura da violaceína — 3-[1,2-Dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]1,3-dihidro-2H-indol-2-ona.

\* Laboratório de Química Aplicada - Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas - Cx. Postal 6154 - Campinas, S.P. CEP-13083-970

\*\* Instituto Adolfo Lutz - Laboratório 1 de Campinas

\*\*\* Instituto Adolfo Lutz - Laboratório 1 de Ribeirão Preto

traído desta bactéria. A violaceína se destaca por sua ampla atividade antibiótica<sup>6,8,14,15</sup>, tripanossomicida<sup>10</sup>, tumoral<sup>9</sup> e potencial fototerapêutico<sup>2,7</sup>. Com o objetivo de buscar novos agentes antimicobacterianos, avaliamos a atividade antimicobacteriana *in vitro* da violaceína frente ao *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra ATCC 25177.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A violaceína foi obtida da *C. violaceum* e purificada de acordo com a metodologia descrita por Reittori & Durán<sup>19</sup>. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada através da técnica da macrodiluição em meio líquido<sup>11</sup>. A diluição inicial da droga foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) (1000 µg/mL) e as diluições subsequentes foram efetuadas em meio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido com ADC (albumina-dextrose-catalase) (Difco) nas concentrações de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 µg/mL. Os tubos controles continham DMSO nas mesmas proporções usadas para as amostras. A cepa de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra ATCC 25177 foi cultivada em meio de Lowenstein-Jensen à 37° C por três semanas e subcultivada em meio líquido de Middlebrook 7H9 enriquecido com ADC (Difco) à 37° C por 10 dias, quando a densidade micobacteriana atinge uma turbidez correspondente à escala padrão N<sup>o</sup> 1 de McFarland. Cinquenta microlitros da suspensão micobacteriana foram adicionados a todos os tubos contendo as diferentes diluições da droga e aos tubos controles também. Os tubos foram incubados à 37° C por 10 dias, quando se realizou a leitura macroscópica do crescimento micobacteriano, por turvação do meio de cultura. A CIM é determinada como a menor concentração da droga capaz de inibir macroscopicamente o crescimento micobacteriano.

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizado o subcultivo em meio de cultura sólido das diluições iguais ou superiores às CIM determinadas pela técnica da macrodiluição. Para isso semeou-se 100 µl dessas diferentes diluições em meio de Lowenstein-Jensen. Os meios de culturas foram incubados à 37° C por 28 dias, para posterior leitura. A CBM foi

definida como a menor concentração da droga capaz de inibir mais de 99,9% da população micobacteriana no meio de cultura.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o advento da AIDS, o número de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes aos diferentes quimioterápicos têm aumentado consideravelmente<sup>4</sup>, dessa maneira, várias têm sido as tentativas no sentido de encontrar alternativas para o tratamento da tuberculose pulmonar. Novos esquemas terapêuticos alternativos estão sendo avaliados em ensaios clínicos a partir da determinação da atividade *in vitro* de novos quimioterápicos.

O presente estudo demonstrou que a violaceína apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 64,0 µg/mL e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 128 µg/mL quando testada frente à cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra. Estes valores de CIM e CBM são altos se comparados com a isoniazida, hidrazida do ácido nicotínico, droga que faz parte do esquema terapêutico atual da tuberculose pulmonar e que apresenta CIM em torno de 0,02 a 0,05 µg/mL, em experimentos utilizando a mesma metodologia empregada neste estudo<sup>17,22</sup>. Comparando porém com o estudo realizado por CYNAMON et al.<sup>5</sup> com a pirazinamida em diferentes cepas de *M. tuberculosis* (ATCC 27294, ATCC 35801 e ATCC 35828) as CIMs variaram de 16 a > 2048 µg/mL, a violaceína mostrou uma atividade antimicobacteriana promissora.

A macrodiluição em meio líquido, utilizada neste estudo, é a metodologia convencional para se determinar a atividade antimicobacteriana de novas drogas frente às micobactérias extracelulares que apresentam multiplicação intensa. Os estudos da atividade bactericida e bacteriostática *in vitro* da violaceína deverão prosseguir especialmente com relação as micobactérias intracelulares, fagocitadas por linhagens de macrófagos humanos. Entretanto, somente os resultados de estudos em modelos animais, poderão predizer de maneira mais acurada, a eficácia da violaceína na terapia antituberculose.

SOUZA, A. O. ; AILY, D.C.G.; SATO, D.N. & DURAN,N. - *In vitro* Activity of violacein against *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 59-62, 1999.

**ABSTRACT:** In this study is are reporting the antimycobacterial activity of violacein, 3-[1,2-Dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indole-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ylidene]1,3-dihydro-2H-indole-2-one, against the *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra strain. The violacein showed antimycobacterial action *in vitro* with the minimal inhibitory concentration (MIC) of 64 µg/mL and minimal bactericidal concentration (MBC) of 128 µg/mL. These values are comparable with those from literature for pyrazinamide.

**DESCRIPTORS:** Violacein, tuberculosis, antimycobacterial, *in vitro*, *Chromobacterium violaceum*, *Mycobacterium tuberculosis*.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARBACHYN, M.R.; HUTCHINSON, D. K.; BRICKNER, S.J.; CYNAMON, M.H.; KILBURN, J.O.; KLEMENS, S.P.; GLICKMAN, S.E.; GREGA, K.C.; HENDGES, S.K.; TOOPS, D.S.; FORD, C.W. & ZURENKO, G.E. Identification of a novel oxazolidinone (U-100480) with potent antimycobacterial activity. *J. Med. Chem.*, **39**: 680-685, 1996.
2. CAMPOS, V.; ERAZO, S. & DURÁN, N. Novos Fotoprodutos com Atividade Antimicrobiana de *Chromobacterium violaceum*. *Arg. Biol. Technol.*, **25**:147, 1982.
3. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Estimates of future global tuberculosis morbidity and mortality. *Morb. Mort. Weekly Rep.*, **39**:1542-1545, 1995.
4. COHN, D.L.; BUSTREO, F. & RAVIGLIONE, M.C. Drug resistant tuberculosis: review of the world wide situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. *Clin. Infect. Dis.*, **24**:S121-S130, 1997.
5. CYNAMON, M.H.; SPEIRS, R.J. & WELCH, J.T. In vitro antimycobacterial activity of 5-Chloropyrazinamide. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**:462-463, 1998.
6. DEMOSS, R.D. Violacein. *Antibiotics*, **2**: 77-81, 1967.
7. DURÁN, N & HAUN, M. Processo de produção, obtenção, purificação e atividade antitumoral de 3-[1,2-Dihidro-5-(5-hidroxi-1-H-indol-3-il)-2-oxo-3-H-pirrol-3-ilideno]1,3-dihidro-2H-indol-2-ona. PI 9702918-1, 1997.
8. DURÁN, N. & FALJONI-ALARIO, A. Bacterial Chemistry-I: Studies of a Potential Phototherapeutic Substance from *Chromobacterium violaceum*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, **55**: 297-302, 1980.
9. DURÁN, N. ERAZO, S. & CAMPOS, V. Bacterial Chemistry-II: Antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, **55**: 231-234, 1983.
10. DURÁN, N.; CAMPOS, V.; RIVEROS, R.; JOYAS, A.; PEREIRA, M.F. & HAUN, M. Bacterial Chemistry-III: Preliminary Studies on Trypanosomal Activities of *Chromobacterium violaceum*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, **61**:31-36, 1989.
11. ERICKSSON, H.M. & SHERIS, J.C. Antibiotic sensitivity testing: report for an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* [B]Suppl., **217**:3-90, 1971.
12. HART, C.A; BEECHING, N.J. & DUERDEN, B.I. Tuberculosis into the next century. *J. Med. Microbiol.*, **44**: 1-34, 1996.
13. KOCHI, A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the world Health Organization. *Tubercle*, **72**: 1-6, 1991.
14. LICHSTEIN, H.C. & VAN DE SAND, V.F.J. Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *J. Infect. Dis.*, **76**:47-51, 1945.
15. LICHSTEIN, H.C. & VAN DE SAND, V.F. The antibiotic activity of violacein, prodigiosin, and phthiocol. *J. Bacteriol.*, **52**: 145-146, 1946.
16. LIMA, M.M.; BELLUOMINI, M.; ALMEIDA, M.M.M. & ARANTES, G.R. Co-infecção HIV/tuberculose: necessidade de uma vigilância mais efetiva. *Rev. Saúde Públ. S. Paulo*, **31**:217-20, 1997.
17. MUSSER, J.M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin. Microbiol. Rev.*, **8**: 496-514, 1995.



18. PARKER, W.L.; RATHNUM, M.L. & JOHNSON, J.H. Aerocyanidin, a new antibiotic produced by *Chromobacterium violaceum*. *J. Antibiot.*, **41**: 454-460, 1988.
19. REITTORI, D. & DURÁN, N. Production, extraction, and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *World J. Microbiol. Biothechn.*; in press.
20. SINGH, P.D.; LIU, W.C.; GOUGOUTAS, J.Z.; MALLEY, M.F.; PORUBCAN, M.A.; TREJO, W.H.; WELLS, J.S. & SYKES, R. B. Aerocavin, a new antibiotic produced by *Chromobacterium violaceum*. *J. Antibiot.*, **41**: 446-453, 1988.
21. SNIDER, D. E. & ROOPER, W. L. The new tuberculosis. *N. Engl. J. Med.*, **326**: 703-705, 1992.
22. TSUKAMURA, M. In vitro bacteriostatic and bactericidal activity of isoniazid on the *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex. *Tubercle*, **71**:199-204, 1990.
23. UEDA, H.; MANDA, T.; MATSUMOTO, S.; MUKUMOTO, S.; NISHIGAKI, F.; KAWAMURA, I. & SHIMOMURA, K. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968:III. Antitumor activities on experimental tumors in mice. *J. Antibiot.*, **47**:315-323, 1994.
24. WAKSMAN, S.A.; BUGIE, E. & SCHATZ, A. Isolation of antibiotic substance from soil microorganisms with special reference to streptothricin and streptomycin. *Mayo Clin Proc.*, **19**: 537-548, 1944.

Recebido para publicação em 04/06/98

## SURTO DE MENINGITE NEONATAL POR *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Ilka Maria LANDGRAF \*  
Alice Massumi Mori KOBATA \*  
Miyoko JAKABI \*\*  
Candida Rosa Alves KIRSCHBAUM \*\*\*  
Cássia Rita MARCHI \*\*\*\*

RIALA 6/853

LANDGRAF, I.M.; KOBATA, A.M.M.; JAKABI, M.; KIRSCHBAUM, C.R.A & MARCHI, C.R. - Surto de meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58 (1): 63-67, 1999.

**RESUMO:** *Listeria monocytogenes*, um bacilo Gram-positivo, asporogênico, tem sido isolada de mamíferos, aves, peixes, crustáceos e insetos, sendo seu habitat primário, o solo e vegetal em decomposição. Causa infecção no homem e animais domésticos. Em humanos ocorre em maior incidência em recém-nascidos e indivíduos acima de 60 anos, sendo a meningite uma manifestação comum de listeriose. De cinco crianças recém-nascidas no mesmo Centro Obstétrico de um hospital da Grande São Paulo, foi isolada *Listeria monocytogenes* do líquido cefalorraquidiano (LCR). Todas as cepas pertenceram ao mesmo sorotipo, L4b. Foi analisada a resistência destas cepas a antibacterianos. As mães de 6 crianças nascidas no período de 14.05 horas, das quais uma foi a óbito sem ter sido puncionado o LCR, tiveram colhidas fezes e urina. Destes materiais não foi isolado o microrganismo.

**DESCRITORES:** *Listeria monocytogenes*, meningite bacteriana, meningite neonatal.

### INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes* é agente bacteriano de infecções em humanos e animais, principalmente domésticos, como gado, carneiros, cabras e aves, e infreqüentemente de animais selvagens<sup>5</sup>.

Esta bactéria foi primeiramente descrita por Murray et alii que a denominaram *Bacterium monocytogenes* devido à característica monocitose observada em coelhos e cobaias infectados em laboratório<sup>5</sup>. Seu nome atual foi dado por Pirie, em 1940<sup>5</sup>.

*L. monocytogenes* é um bacilo Gram-positivo, asporogênico, anaeróbico facultativo, que cresce entre

-0,4 e 50° C. Possui flagelos peritríquios que lhe proporcionam uma motilidade que causa turvação em forma de guarda-chuva em meio de cultura semi-sólido e à temperatura de 20-25° C e que a 37° C podem ser perdidos. O microrganismo expressa também uma hemólise total ou β (beta) em ágar-sangue. A hemolisina atua sinergisticamente com a hemolisina total ou β (beta) de *Staphylococcus aureus* sobre eritrócitos de carneiro, a qual é mediada pelo fator CAMP<sup>5</sup>. *L. monocytogenes* está largamente presente nas plantas, solo, superfície de águas, detritos, esgoto, leite de vacas normais e com mastite e fezes de animais e humanos<sup>5,7</sup>.

\* Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

\*\* Seção de Microbiologia Alimentar.

\*\*\* Divisão de Ações de Vigilância Epidemiológica e Sanitária da Prefeitura Municipal de S. Bernardo do Campo, SP.

\*\*\*\* Laboratório da P.M. de S. Bernardo do Campo, SP.

Taxonomicamente, está colocada junto com *Brochothrix*, ambos gêneros ocupando uma posição entre *Lactobacillus* e *Bacillus*<sup>5</sup>.

Infecções humanas por *L. monocytogenes* ocorrem em maior incidência em recém-nascidos, seguidos por indivíduos na faixa etária acima de 60 anos<sup>5</sup>.

Em vista da grande tendência da *L. monocytogenes* infectar as meninges, meningite é uma manifestação comum de listeriose dentre as manifestações infecciosas do sistema nervoso central, principalmente em recém-nascidos<sup>5</sup>.

Listeriose materna em gestantes pode estar associada a aborto no 3º trimestre, como também já foi observado no 1º e 2º trimestres, e geralmente a infecção se manifesta como nascimento prematuro<sup>5</sup>.

Filice et alii<sup>6</sup>, estudando a ocorrência de 7 casos de infecção por *L. monocytogenes* em recém-nascidos, dos quais 6 desenvolveram meningite e um septicemia, observaram que 6 das 7 mães apresentaram relatos de vaginite durante a gravidez.

No entanto, listeriose materna não conduz inevitavelmente à infecção do feto<sup>10</sup>.

A ocorrência de listeriose em mulheres gestantes e imunocomprometidas levou a sugestões de que listeriose pode ser uma importante doença não reconhecida em mulheres gestantes com imunidade deficiente<sup>5</sup>.

A fonte do microrganismo é incerta, embora a infecção possa ser adquirida do trato genital da mãe durante o nascimento ou do ambiente após o nascimento<sup>5,6</sup>.

Neste trabalho são relatados 5 casos de meningite por *L. monocytogenes* em recém-nascidos, ocorridos em um hospital da Grande São Paulo em um período de 14,05 horas, e que levou duas destas crianças a óbito. Os sintomas que estas crianças apresentaram foram: gemência (100 %), hipoatividade (100 %), febre  $\leq 38,5$  (100 %), dificuldade de deglutição (100 %), vômitos (60 %), diarreia (40 %), convulsão (40 %). Outra criança, nascida no mesmo período, não teve seu caso investigado e confirmado pois foi a óbito no berçário após 48 horas do nascimento, sem notificação, e sem ter tido o LCR colhido, porém apresentou alguns dos sintomas das outras crianças.

## MATERIAL E MÉTODOS

O crescimento bacteriano de culturas de 5 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes recém-nascidos, com meningite, e isoladas no laboratório da Prefeitura Municipal de S. Bernardo do Campo, SP, foram recebidas no laboratório da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, SP, para sua identificação. De uma das crianças, a 6ª delas, não foi

puncionado LCR por ter já ocorrido seu óbito. Esfregaços destas culturas corados pelo método de Gram, modificado por Hucker, revelaram bacilos Gram-positivos. Foi processada a semeadura em placa de ágar-sangue de carneiro e em meio de manitol-motilidade a 20-25° C. A seguir foram realizadas as provas de catalase e oxidase e provas bioquímicas de nitrato redutase, urease e fermentação de glicose, sacarose, xilose, maltose, salicina, arabinose, dulcitol, lactose, manitol, trealose, raminose, e o CAMP-teste<sup>4,5</sup>. Embora as cepas estivessem puras, foram semeadas também em ágar PALCAM (11,13) e incubadas a 30° C em microaerofilia (lata com vela acesa), com observação do crescimento característico em 48 hs. Foi realizada a prova de patogenicidade experimental com inoculação da cepa em conjuntiva de cobaia (Prova de Anton)<sup>5</sup>.

Das 5 cepas isoladas foi realizado o teste de sensibilidade a antibacterianos através do método da difusão de discos impregnados com os antibacterianos (CECON), segundo metodologia descrita<sup>1</sup>.

Fezes e urina de 6 mães das crianças afetadas foram colhidas e examinadas através de semeadura direta em meio de ágar PALCAM, (35° C / 24-48 hs) e em caldo de enriquecimento para *Listeria*, LEB<sup>8</sup>, durante 48 hs e até 7 dias, o qual foi então semeado também em ágar PALCAM.

A identificação dos sorotipos foi realizada por Dr. Ernesto Hofer, no Laboratório de Zoonoses Bacterianas/Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz, Rio, RJ.

## RESULTADOS

Das culturas de LCR de 5 crianças recém-nascidas foi identificada *L. monocytogenes* através do exame bacterioscópico que evidenciou bacilo Gram-positivo, das características culturais e bioquímicas compatíveis com esta bactéria, pela prova de Anton positiva e ocorrência de turvação típica em forma de guarda-chuva em meio manitol-motilidade a 20-25° C, após 72 hs de incubação (Tabela 1). No meio de cultura PALCAM as colônias crescidas após 48 hs apresentaram aspecto característico de *L. monocytogenes*, ou seja, colônias cinza-esverdeadas com centro rebaixado preto e circundadas por um halo preto, coloração devida à presença de esculina (hidrólise), ferro, manitol e vermelho de fenol no meio de cultura. O CAMP-teste foi positivo para todas as 5 cepas testadas, como pode ser observado em 4 dos resultados que foram fotografados (Fig. 1).

O antibiograma demonstrou que as cepas apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade ou resistência a 16 dos 17 antibacterianos testados (Tabela 2).

A identificação dos sorotipos revelou o mesmo sorotipo L4b para as 5 amostras da bactéria.

Das amostras de fezes e urina das mães das crianças nascidas no mesmo local, não houve crescimento característico de *L. monocytogenes* no meio de cultura ágar PALCAM, mesmo após enriquecimento em LEB (48 hs e até 7 dias) e nova semeadura em ágar PALCAM.

TABELA 1

Resultado das provas laboratoriais que caracterizaram as 5 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de líquido cefalorraquidiano (LCR) dos recém-nascidos.

Hemólise	Total ou $\beta$ (beta)
Catalase	Positiva
Oxidase	Negativa
Nitrato redutase	Negativa
CAMP-teste	Positivo
Glicose	Positiva (sem gás)
Sacarose	Negativa ou positiva
Xilose	Negativa
Maltose	Positiva
Salicina	Positiva
Arabinose	Negativa
Dulcita	Negativa
Lactose	Positiva após 7 dias
Manitol	Negativa
Trealose	Positiva
Ramnose	Positiva
Prova de Anton	Positiva
Sorotipo	L4b

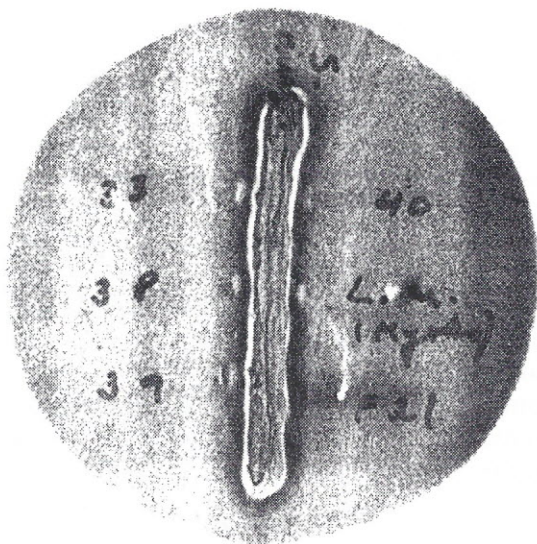


FIGURA I — CAMP-teste em cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de recém-nascidos: numeros 33, 38, 39, 40; cepa padrão — controle positivo (*L. m.* — Miyoko) e cepa F21 — controle negativo.

TABELA 2

Perfil de sensibilidade ou resistência a antibacterianos de 5 cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de líquido cefalorraquidiano dos recém-nascidos.

Antibacterianos	Resultado do teste	Percentual de Resistência
Amicacina (30 mcg)	Resistente	60
Ampicilina (10 mcg)	Resistente	100
Amoxicilina (30 mcg)	Resistente	100
Cefalotina (30 mcg)	Sensível	0
Cefodizima (30 mcg)	Resistente	100
Cefoperazona (75 mcg)	Resistente	100
Cefotaxima (30 mcg)	Resistente	100
Ceftazidima (30 mcg)	Resistente	100
Ceftriaxona (30 mcg)	Resistente	100
Clindamicina (2 mcg)	Resistente	100
Eritromicina (15 mcg)	Sensível	0
Gentamicina (10 mcg)	Sensível	0
Oxacilina (1 mcg)	Resistente	100
Penicilina (10 U.I.)	Resistente	100
Sulfazotrim (25 mcg)	Sensível	0
Tetraciclina (30 mcg)	Sensível	0
Vancomicina (30 mcg)	Sensível	0

## DISCUSSÃO

*L. monocytogenes*, a única espécie do gênero que causa infecção no homem<sup>11</sup>, tem sido isolada de 42 espécies de mamíferos, 22 espécies de pássaros, peixes, crustáceos e insetos. No entanto, o habitat primário tem sido considerado ser o solo e matéria vegetal em decomposição, no qual ela sobrevive e cresce saprofiticamente.

Quando introduzida em um hospedeiro animal ou humano, ela evolui para produzir fatores de virulência.

O isolamento da bactéria de humanos foi confirmado por Nyfeldt<sup>3</sup>, em 1929. Casos esporádicos de listeriose tem sido reportados, frequentemente em trabalhadores em contato com animais doentes<sup>2</sup>. Contudo, a associação de *L. monocytogenes* com muitos surtos de origem alimentar sugere que alimentos contaminados possam ser a fonte primária do microrganismo<sup>5</sup>.

Dentre as infecções de maior incidência em recém-nascidos e adultos em faixa etária acima de 60 anos, a meningite por *L. monocytogenes* está relacionada com uma alta mortalidade. Em um estudo desenvolvido por Farber & Peterkin<sup>5</sup>, em 1989, casos de meningite apresentaram 43,8% de letalidade, enquanto outros autores<sup>12</sup> citam um nível de fatalidade de 22%.

Dos 6 casos de recém-nascidos que ocorreram no Centro Obstétrico do mesmo hospital da Grande São Paulo, os intervalos de nascimento chegaram a ser de apenas 10 minutos entre dois deles, e todos eles aconteceram em um período de 14,05 hs, ou seja, das 8,40 hs da manhã às 03,45 hs da madrugada do dia seguinte. Três destas crianças foram a óbito, das quais uma não teve LCR colhido por já ter ocorrido o óbito quando ainda no berçário e sua morte não ter sido investigada e notificada, porém apresentava sintomas semelhantes aos das outras crianças. Foi observado que o óbito ocorreu nas primeiras crianças que apresentaram a sintomatologia característica. Este fato pode ter sido determinado pelo comportamento das cepas frente aos 17 antibacterianos testados, pois todas elas apresentaram resistência a 10 deles (58,8 %), dentre os quais Ampicilina e Ceftriaxona, antibióticos de largo uso atualmente em nosso meio, particularmente na fase inicial das meningites, quando ainda não foi esclarecido o agente etiológico. Convém lembrar que estes dois antibióticos devem ser indicados com cuidado para menores de 30 dias (recém-nascidos) em meningites de etiologia a esclarecer, pois nessa faixa etária a *Listeria* é um dos agentes prováveis. O estudo do perfil de resistência destas cepas demonstrou que elas se apresentaram resistentes a um número bem maior de antibacterianos do que cepas de *L. monocytogenes* isoladas em períodos anteriores<sup>4</sup>. Com o conhecimento dos resultados dos testes de sensibilidade aos antibacterianos das cepas isoladas dos primeiros casos, foi possível um direcionamento adequado no tratamento dos casos que se sucederam, com a seleção dos antibióticos aos quais a bactéria apresentou sensibilidade, e conseqüente não ocorrência de óbitos nestas crianças.

Nas 5 crianças que tiveram LCR puncionado e *L. monocytogenes* identificada, os sintomas compatíveis de meningite surgiram 4 a 10 dias após o nascimento.

Filice e col.<sup>6</sup>, estudando a ocorrência de 7 casos de listeriose, dos quais 6 com meningite e um com septicemia, observaram que os sintomas se iniciaram em um período próximo ao das crianças por nós estudadas, ou seja, entre uma a 4 semanas após o nascimento. Estes autores relatam também que das mães destas crianças foram realizadas culturas de material obtido de faringe, vagina e fezes, com resultados negativos para *L. monocytogenes*.

Farber & Peterkin<sup>5</sup> citam um estudo desenvolvido para a observação da duração da excreção fecal de *L. monocytogenes* em 12 pessoas, durante um período de 16 meses, das quais 11 excretaram o microrganismo em períodos de um a 6 meses. Também Hofer<sup>7</sup> estudou a ocorrência de portadores em trabalhadores de frigoríficos e matadouros, através do exame de fezes.

No nosso estudo, examinando-se fezes e urina das 6 mães dos bebês, não foi obtido isolamento da bactéria destas fontes.

Os sorotipos das cepas isoladas do LCR de todas as 5 crianças pertenceram ao mesmo sorotipo, L4b, sorotipo este que em 12 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de LCR, no laboratório de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, corresponderam a 83,3% das cepas, cujos pacientes tiveram idades que variaram de 18 dias a 49 anos<sup>4</sup>.

Do estudo desenvolvido, pôde-se observar que, corroborando a citação de outros autores<sup>5,6</sup> de que a fonte e a via de infecção por *L. monocytogenes* são geralmente desconhecidas, a fonte e via de infecção dos 5 recém-nascidos que desenvolveram uma infecção que evoluiu para meningite não foi esclarecida.

Na conclusão deste estudo, consideramos importante lembrar que bacilos Gram-positivos, principalmente os isolados de sangue e LCR, devem ser corretamente identificados antes de serem desprezados como um possível contaminante inserido no material biológico. Nestes casos o agente etiológico pode ser de múltiplas procedências, e em se tratando de *L. monocytogenes*, como já dito anteriormente, o índice de mortalidade é dos mais elevados dentre as meningites bacterianas. Consideramos que seja possível que a raridade da listeriose em nosso meio se deva mais a problemas de busca do agente etiológico através de técnicas laboratoriais adequadas.

LANDGRAF, I.M.; KOBATA, A.M.M.; JAKABI, M; KIRSCHBAUM, C.R.A. & MARCHI, C.R. — An outbreak of *Listeria monocytogenes* meningitis in neonates. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58(1): 63-67, 1999.

**ABSTRACT :** *Listeria monocytogenes*, a Gram-positive, nonsporeforming rod has been isolated from mammals, birds, fish, crustaceans, and insects, being the primary habitats, the soil and decaying vegetable matter. It causes infection in humans and domestic animals. In humans it occurs with the highest incidence in neonates and in individuals older than 60, being meningitis a common manifestation of listeriosis. From five neonates borne at the same Obstetric Center of an hospital in Great São Paulo, *L. monocytogenes* was isolated from cerebrospinal fluid (CSF). All strains belonged to the same serovar, L4b. The resistance to antibacterial agents was tested. The mothers of 6 neonates, one of which died before having the CSF obtained, had stool and urine collected. From these materials the microorganism was not isolated.

**DESCRIPTORS :** *Listeria monocytogenes*, bacterial meningitis, neonate meningitis.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. clin. Path.*, **45**: 493-496, 1966.
2. CAIN, D.B. & McCANN, V.L. - An unusual case of cutaneous listeriosis. *J. clin. Microbiol.*, **23**:976-977, 1986
3. CARTER, G.R. - *Listeria and Erysipelothrix*. In: Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology, 5<sup>th</sup> ed., CARTER, G.R. & COLE, Jr, J.R. eds., Califórnia, USA, 1990, p. 254-259.
4. ESPER, M.R.N.R.; PESSÔA, G.V.A.; HOFER, E.; LEE, I.M.L.; MELLES, C.E.A.; SAKATA, E.E. & CALZADA, C.T. - Meningite por *Listeria monocytogenes* em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **38** (1):37-41, 1978.
5. FARBER, J.M. & PETERKIN, P.I. - *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, **55** (3):476-511, 1991.
6. FILICE, G.A.; CANTRELL, H.F.; SMITH, A.B.; HAYES, P.S.; FEELEY, J.C. & FRASER, D.W. - *Listeria monocytogenes* infections in neonates : investigation of an epidemic. *J. Infect. Dis.*, **138**:17-23, 1978.
7. HOFER, E. - Contribuição ao estudo epidemiológico da ocorrência de portadores de *Listeria monocytogenes* entre operários de matadouro e indivíduos com distúrbios entéricos. Rio de Janeiro, 1974. [Tese livre-doc. - Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro]
8. LOVETT, J.; FRANCIS, D.W. & HUNT, J.M. - *Listeria monocytogenes* in raw milk: Detection, incidence, and pathogenicity. *J. Food Prot.*, **50**:188-192, 1987.
9. PARK, S.F. & KROLL, R.G. - Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.*, **8**:653-661, 1993.
10. SMITH, A.R.; LIEBERMAN, B.A.; ALLEN, L. & BARSON, A.J. - Listeriosis and pregnancy. *Lancet* **ii**:1364, 1983.
11. SWAMINATHAN, B., ROCOURT, J. & BILLE, J. - *Listeria*. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C. & Tenover, R.H. (eds) - *Manual of Clinical Microbiology*, 7<sup>th</sup> ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1995, p. 341-348.
12. WENGER, J.D.; HIGHTOWER, A.W.; FACKLAM, R.R.; GAVENTA, S.G.; BROOME, C.V. & THE BACTERIAL MENINGITIS STUDY GROUP - Bacterial meningitis in the United States, 1986 : report of a multi-state surveillance study. *J. Infect. Dis.*, **162**:1316-1323, 1990.
13. VAN NETTEN, P.; PERALES, I.; MOOSDIJK, A.V.D.; CURTIS, G.D.W. & MOSEL, D.A.A. - Liquid and solid differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. *Int. J. Food Microbiol.* **8** (4): 299-316, 1989.

Recebido para publicação em 17/06/98

## DEFUMAÇÃO LÍQUIDA DA ANCHOVA (*Pomatomus saltatrix*): ESTABILIDADE LIPÍDICA DURANTE O PROCESSAMENTO E O ARMAZENAMENTO

Alex Augusto GONÇALVES\*  
Carlos PRENTICE-HERNÁNDEZ\*

RIALA 6/854

GONÇALVES, A. A. & PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. - Defumação Líquida da Anchova (*Pomatomus Saltatrix*): estabilidade lipídica durante o processamento e o armazenamento. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58(1): 69-78, 1999.

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar possíveis alterações na fração lipídica de filés de anchova sem pele durante a defumação líquida, bem como em diferentes condições de armazenamento do produto final. Para a anchova *in natura* utilizada como matéria-prima, e para o produto defumado obteve-se os seguintes resultados de composição química: 69,38% e 59,79% de umidade; 1,09% e 2,45% de cinzas; 16,80% e 22,30% de proteínas; 12,43 e 15,21% de gordura, respectivamente. Como parâmetro de oxidação lipídica para a anchova *in natura*, obteve-se os seguintes resultados de número de TBA e índice de peróxidos: 0,04 mg MA/Kg músculo e 6,76 meq. peróxidos/Kg gordura; e para a anchova defumada: 0,06 mg MA/Kg de músculo e 8,84 meq. peróxidos/Kg de gordura. Com relação às amostras armazenadas sob congelamento (-21,64 °C), observou-se que o processo de oxidação lipídica não foi pronunciada durante os 60 dias de armazenamento. Já nas amostras armazenadas sob refrigeração (5,74 °C) houve uma tendência de oxidação lipídica caracterizada pelo aumento do número de TBA. As amostras armazenadas à temperatura ambiente (18,71 °C) apresentaram a partir da primeira semana um aumento do número de TBA e índice de peróxidos, evidenciando o processo de oxidação lipídica. Entretanto, a partir da quarta semana (28 dias) esta oxidação lipídica perdeu seu valor e uma deterioração microbiológica tornou-se mais evidente (odor pútrido).

**DESCRITORES:** anchova, defumação, fumaça líquida, oxidação lipídica, estabilidade

### INTRODUÇÃO

A defumação de alimentos por meio de aspersão de fumaça (defumação convencional) está sendo substituída cada vez mais pelo emprego de fumaça líquida. O âmbito de aplicação das fumaças líquidas é muito amplo, sendo principalmente utilizadas em carnes (bovina, suína e aves), carnes processadas, pescado, queijo podendo-se estender, por sua grande versatilidade, a uma grande variedade de alimentos que tradicionalmente não se defumam, como: temperos, sopas, vegetais enlatados, ou condimentos<sup>15, 22, 29, 34</sup>.

Desde 1993 a Agência Federal de Saúde e do Meio Ambiente dos EUA, vem afirmando que a fumaça líquida possui a mesma capacidade preservativa que a fumaça natural (ação antioxidante e antimicrobiana), além de poder apresentar o mesmo perfil aromático ou outros muito diferentes, dependendo de sua forma de elaboração, sem no entanto, apresentar compostos indesejáveis, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos<sup>15</sup>.

A qualidade do produto defumado e o tempo de conservação dependerá principalmente do frescor do pescado inteiro e do conteúdo de gordura<sup>2, 26, 30</sup>.

\* Laboratórios de Bioquímica Tecnológica e de Análise Instrumental Química - Departamento de Química - Fundação Universidade do Rio Grande (FURG) - Rua Eng. Alfredo Hüch, 475 - C.P. 474 - 96201-900 - Rio Grande - RS - Brasil

A qualidade biológica do produto também é muito importante, sendo que deve-se considerar, no caso do pescado, se é pelágico ou demersal, ou seja, de acordo com seu *habitat*, este será um pescado gordo ou magro<sup>10, 12</sup>. Este conteúdo de gordura no pescado, em excesso ou em escassez, poderá resultar numa qualidade inferior do produto final, sendo que um conteúdo de gordura desejável fica em torno de 7-12%<sup>30, 36</sup>.

A anchova apresenta músculo escuro, gorduroso e com sabor forte. Quando a anchova é eviscerada e mantida no gelo, sua vida-de-prateleira não ultrapassa mais do que 1-2 dias. Após este período, a fração lipídica começa a oxidar e o pescado torna-se rançoso. A anchova congelada também tem sua vida-de-prateleira limitada<sup>9</sup>.

Durante o tratamento térmico, pode ocorrer um aumento da oxidação e rancidez, causando pequena redução na qualidade protéica. A secagem conduzida entre 70-80 °C ou à temperaturas inferiores causa danos insignificantes nas frações lipídica e protéica, enquanto que a temperaturas elevadas (maiores que 115 °C) os efeitos negativos podem ser marcantes<sup>28</sup>. Assim, devido a oxidação que ocorre pelo aquecimento são necessários maiores cuidados no processamento e armazenamento de músculo de pescado, especialmente o gorduroso como a sardinha, arenque, anchova e outros<sup>7</sup>.

Os pescados defumados também são produtos perecíveis e necessitam de acondicionamento a baixas temperaturas. A alteração do pescado defumado à temperatura de refrigeração é similar à do pescado não defumado, ocorrendo as mesmas mudanças de sabor e odor<sup>39</sup>. Sua vida-de-prateleira depende de muitos fatores, principalmente da espécie utilizada e de sua qualidade inicial, tipo de preparo da matéria-prima (inteiro, eviscerado, filetado) além da concentração de sal, da temperatura de defumação, composição da fumaça, tipo de embalagem, higiene e temperatura de estocagem. Pescado defumado a quente e estocado a 4 °C, geralmente tem uma vida-de-prateleira de 2 semanas, enquanto que pescado defumado (a frio) que é mais salgado e exposto à ação da fumaça de 6 à 8 horas, pode ser mantido sob refrigeração mantendo sua qualidade por 2 meses<sup>19, 20, 23, 25</sup>.

Considerando que na região sul do Rio Grande do Sul, a pesca direcionada à anchova, principalmente nos meses de outono, inverno e primavera, é muito significativa, os objetivos principais deste trabalho foram: 1) elaborar um produto defumado à base de anchova (*Pomatomus saltatrix*) utilizando aroma natural de fumaça; 2) avaliar a estabilidade da fração lipídica da matéria-prima durante o processamento e do produto final defumado em diferentes condições de armazenamento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

A matéria-prima utilizada foi a espécie anchova (*Pomatomus saltatrix*), capturada na região sul do Rio Grande do Sul, por pescadores artesanais, e desembarcada nos trapiches localizados na 4ª Secção da Barra da Lagoa dos Patos, em Rio Grande (RS), durante os meses da safra (entre junho e setembro).

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Bioquímica Tecnológica e de Análise Instrumental Química, do Departamento de Química da Fundação Universidade do Rio Grande (FURG), na cidade do Rio Grande (RS).

A fumaça líquida indicada para a defumação<sup>1, 32, 33, 34</sup> foi obtida por meio de uma doação da ADICON Indústria e Comércio de Aditivos Ltda (São Bernardo do Campo - SP) e apresentava as seguintes características físico-químicas: acidez total (como ácido acético, 14,0-16,0%), compostos de aroma de fumaça (15,0-22,0 mg/ml), carbonilos (17,0-22,0%) e densidade (1,12 Kg/l). Os reagentes químicos (todos de qualidade P.A.) foram adquiridos no comércio da região de Rio Grande (RS).

### Processamento experimental

O processo de defumação líquida da anchova foi realizado de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 1.

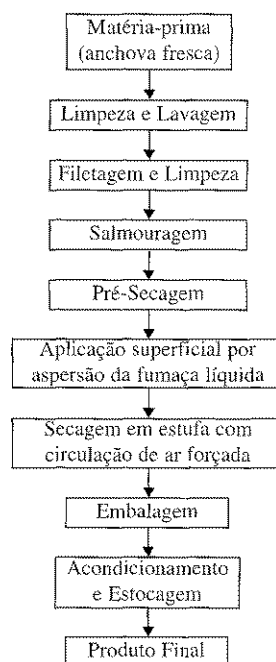


Figura 1 — Fluxograma operacional da defumação líquida da anchova



De acordo com a Figura 1, utilizou-se como matéria-prima anchova fresca, que foi lavada e filetada logo após sua obtenção. A salmouragem consistiu no preparo de uma solução de cloreto de sódio a 20% (p/v), onde os filés foram imersos por 15 minutos com agitação constante, para conferir ao produto final um teor de NaCl de aproximadamente 4% (p/p)<sup>5</sup>.

Para uma melhor penetração da fumaça líquida no músculo da anchova, foi executado uma pré-secagem do filé em estufa com circulação de ar<sup>26</sup> (com velocidade superior a 1 m/s) durante 45 minutos a 49,5 °C. Após essa etapa, a defumação líquida foi realizada por aspersão da fumaça líquida (a 20%) na superfície do filé (ambos os lados) durante 60 segundos, seguido por um tratamento térmico<sup>14</sup>, delineado da seguinte maneira: 45 min. a 52,8 °C; 45 min. a 67 °C e 2h 30 min. a 80,8 °C. No final da secagem, as bandejas foram retiradas da estufa, e os filés foram resfriados em temperatura ambiente, embalados individualmente em sacos plásticos (polietileno), e depois etiquetados e armazenados. Uma parte dos filés de anchova defumados foi reservada e mantida sob refrigeração (5 °C) até o momento das análises química (feitas no mesmo dia), e o restante, submetidos a diferentes condições de armazenamento.

#### Análise química

Amostras de filé de anchova sem pele *in natura* e defumado foram triturados em multiprocessador, até obter-se uma polpa homogênea. Alíquotas desta polpa foram utilizadas para as determinações de composição centesimal (umidade, cinza, gordura e proteína), de acordo com a metodologia oficial<sup>3</sup>.

Para melhor observar o andamento do processo oxidativo utilizou-se as determinações de índice de peróxidos<sup>3</sup> e o número de ácido tiobarbitúrico<sup>24</sup> adaptado para a anchova<sup>14</sup>, nas amostras de filé *in natura* e no produto final defumado.

#### Oxidação lipídica durante o processamento

A alteração química do produto, com relação à oxidação lipídica, foi acompanhada durante o processo de defumação. As amostras foram retiradas durante o processo de secagem a cada 15 minutos, em seguida homogeneizadas em multiprocessador e analisaram-se o índice de peróxidos<sup>3</sup> e o número de TBA<sup>24</sup>.

#### Oxidação lipídica no armazenamento do produto final

Após o processo de defumação, os filés devidamente resfriados e embalados foram armazenados durante 60 dias, sob temperatura ambiente (20 °C), temperatura de refrigeração (5 °C) e temperatura de congelamento (-20 °C).

Foi feito o acompanhamento da oxidação lipídica a cada 7 dias, durante todo o tempo de armazenamento, sendo que para isto foram utilizadas as determinações do índice de peróxidos e número de TBA. Houve também um acompanhamento diário das temperaturas em cada condição de armazenamento.

#### Análise Estatística

Os resultados das determinações químicas da anchova *in natura* e defumada foram analisados estatisticamente através da análise descritiva de dados, utilizando o software "Statistica for Windows" versão 4.3.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Análise química

O conhecimento da variação sazonal da composição química do pescado é de grande importância tecnológica pois afeta o rendimento, sabor, textura e a estabilidade à oxidação da gordura, seja pelo aumento da insaturação ou pela variação dos antioxidantes naturais<sup>10, 21</sup>. Procurou-se trabalhar com lotes da mesma procedência (coleta) para evitar diferenças de composição química.

Os resultados de composição química da matéria-prima e do produto final se encontram na Tabela 1.

TABELA 1

Composição química\* da matéria-prima e do produto final (média desvio padrão)

Componentes	<i>in natura</i>	Defumado
UMIDADE (%)	69,38 ± 1,03	59,79 ± 0,28
PROTEÍNA (N x 6,25) (%)	16,80 ± 0,11	22,30 ± 0,15
GORDURA (%)	12,43 ± 1,06	15,21 ± 0,25
CINZA (%)	1,09 ± 0,02	2,45 ± 0,02
I.P. (meq. peróxido/kg gordura)**	6,76 ± 0,37	8,84 ± 0,38
I.P. (meq. peróxido/kg amostra)	0,84 ± 0,05	1,34 ± 0,06
TBA (mg MA/kg amostra)	0,040 ± 0,002	0,060 ± 0,01

\* feita em quadruplicata;

\*\* unidade expressa em meq. peróxido/kg gordura para efeito de comparação com dados citados na literatura.

Os valores de composição centesimal da matéria-prima “*in natura*” estão de acordo com a literatura, e segundo CONTRERAS-GUZMÁN<sup>10</sup> se enquadra na categoria B, considerada como intermediária por sua quantidade de proteína e gordura.

Um dos métodos mais utilizados em produtos cárnicos para estimar a extensão da estabilidade lipídica é o teste do TBA, e vem sendo freqüentemente aperfeiçoado devido aos avanços analíticos na busca de se obter dados mais confiáveis<sup>13, 37</sup>.

A determinação do índice de peróxidos (I.P.) é limitada pela natureza transitória dos peróxidos os quais são produtos intermediários na formação de compostos carbonílicos. Um determinado valor de I.P. pode proporcionar uma informação insuficiente do grau de rancidez existente. Devido a essa natureza transitória dos produtos, é necessário que se utilize pelo menos dois testes paralelamente<sup>7, 8, 13</sup>. Para garantir a confiabilidade dos resultados resolveu-se utilizar esses dois métodos.

De acordo com a faixa de valores de TBA (0,215 a 3,32 mg MA/kg músculo) para pescado encontrada na literatura<sup>37</sup>, os valores encontrados para a anchova *in natura* (0,04) estão bem abaixo dos limites considerados de baixa qualidade.

SINNHUBER & YU<sup>38</sup> comentaram que, para peixes enlatados e congelados, o número de TBA menor que 3,0

indica uma boa qualidade, enquanto que valores maiores de 4,0 representam produtos de qualidade inferior.

Verificou-se na Tabela 1, que o processo de defumação líquida alterou a relação percentual dos componentes da matéria-prima original. Ao diminuir o conteúdo de umidade (de 69,38% para 59,79%), incrementou-se a proporção do conteúdo de proteínas (de 16,80% para 22,30%) e gordura (de 12,43% para 15,21%). O aumento do conteúdo de cinzas (de 1,09% para 2,45%) é provavelmente conseqüência da absorção de cloreto de sódio no músculo, durante a imersão na salmoura. Esses resultados estão de acordo com os valores encontrados para diferentes espécies de peixes marinhos defumados<sup>31</sup>.

Também, os valores do número de TBA estão bem abaixo aos encontrados por BHUIYAN, RATNAYAKE & ACKMAN<sup>6</sup> para cavala defumada (0,494 mg MA/Kg músculo) e pelo fato do índice de peróxidos estar próximo ao encontrado para esta espécie (8,96 meq./Kg gordura), este pode estar evidenciando também o início do processo oxidativo da fração lipídica.

#### Oxidação lipídica da anchova durante o processamento

A Figura 2 mostrou o avanço da oxidação lipídica na anchova durante o processamento com fumaça líquida.

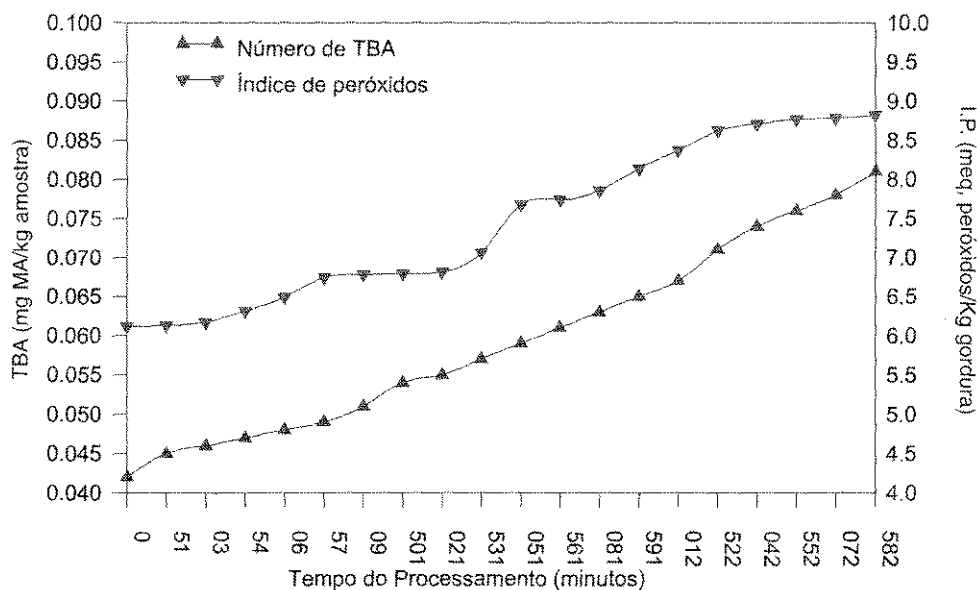


FIGURA 2. Oxidação lipídica durante o processo de defumação líquida da anchova.

A velocidade e extensão dos processos oxidativos dos lipídios de pescado depende de inúmeros fatores, como a temperatura utilizada, os distintos tratamentos e operações como picado, cocção, defumação e salga<sup>6,17</sup>.

WOOLFE<sup>40</sup>, examinando os valores de I.P. em função do tempo de secagem (60-100 °C), durante a defumação, indicou que a oxidação lipídica pode ser iniciada a partir do processo de secagem.

Com os resultados de TBA mostrados na Figura 2, verificou-se que houve início do processo oxidativo, mas os valores de TBA aumentaram pouco durante o processamento, talvez indicando que a oxidação lipídica encontrava-se no período de indução, devido ao aumento do índice de peróxidos (I.P.) durante o processamento.

BELTRÁN & MORAL<sup>4</sup> examinaram a rancificação de sardinhas durante o processo de defumação e verificaram um pequeno aumento do índice de peróxidos (de 0,77 para 2,73 meq/Kg gordura) e número de TBA (de 0,025 para 0,093 mg MA/Kg músculo). Esse aumento do I.P. pode ser devido à autooxidação de alguns ácidos graxos presentes na fração lipídica da sardinha ( $C_{18,4}$ ,  $C_{20,4}$ ,  $C_{20,5}$ ,  $C_{22,5}$  e  $C_{22,6}$ ), enquanto que a variação do número de TBA representa a detecção de produtos resultantes da oxidação (principalmente o malonaldeído), que também são indicativos de oxidação.

A abundância de compostos fenólicos solúveis (semelhantes aos antioxidantes BHA, BHT e propilgalato) presentes na fumaça líquida inibe o desenvolvimento da rancidez oxidativa. As preparações de fumaça em óleo contêm compostos fenólicos que apresentam excelentes propriedades antioxidantes. Entretanto, mesmo que a solução seja aquosa, a inibição da oxidação vai ocorrer em virtude de os compostos fenólicos lipossolúveis migrarem da solução aquosa para os compostos graxos do alimento<sup>18</sup>.

HORNER<sup>19</sup> afirma que o contato da fumaça líquida com o pescado gordo antes do processo de secagem é mais efetivo na redução da rancidez quando do que o processo tradicional de defumação para um pescado com mesmo teor de gordura e umidade.

### ***Oxidação lipídica da anchova defumada durante o armazenamento***

Depois do tratamento térmico, é de vital importância manter os produtos defumados sob condições de

refrigeração, preferencialmente a 2 °C para impedir o desenvolvimento de bactérias patogênicas, geradoras de toxinas nos alimentos. Entretanto, existem microorganismos psicrófilos, que possuem a capacidade de desenvolver-se a temperaturas mais baixas que as normais de refrigeração<sup>39</sup>.

A proposta inicial de armazenamento foi manter o produto defumado em três condições de temperatura: a -20 °C, 5 °C e 20 °C. Não houve muita variação nas condições de congelamento (-21,6 1,2 °C) e refrigeração (5,7 0,8 °C); entretanto, à temperatura ambiente (18,7 2,1 °C) sofreu algumas oscilações durante a estocagem.

MORAIS<sup>26</sup> comenta que o pescado defumado nem sempre se conserva em bom estado até o momento de seu consumo. À temperatura de refrigeração (3 °C), produtos defumados gordurosos se mantêm em boas condições por cerca de 6 dias, enquanto que a 10°C sua vida-de-prateleira é reduzida para 2 a 3 dias. Quando congelados e estocados a -30 °C, sua vida-de-prateleira se estende pelo menos por 6 meses, e por um período maior quando embalado a vácuo.

Amostras de salmão defumado com alto teor de NaCl na fração aquosa (4,6%) estocados a 5 °C e 10°C tiveram sua vida-de-prateleira pelo menos 2 a 3 semanas a mais que as com menor teor de NaCl (2,2%) nas mesmas temperaturas. Entretanto, aumentando a temperatura de estocagem de 5 °C a 10 °C verificou-se um decréscimo da vida-de-prateleira de 1-2 semanas para as amostras com alto teor de NaCl e de 2-3 semanas para as amostras com baixo teor de NaCl<sup>16</sup>.

Com relação à oxidação lipídica dos filés de anchova defumados durante o armazenamento (mostrado na Figura 3), observa-se uma certa constância nos valores de TBA e e uma queda nos valores de peróxidos, das amostras estocadas sob congelamento (-21,64 °C), indicando que o processo de oxidação lipídica poderia estar estacionado no período de indução, não apresentando portanto, grande importância durante o armazenamento por 60 dias. Já nas amostras armazenadas sob refrigeração (5,74 °C), houve uma tendência de oxidação verificada pela queda do índice de peróxidos e pelo aumento progressivo do número de TBA durante os dias de armazenamento.

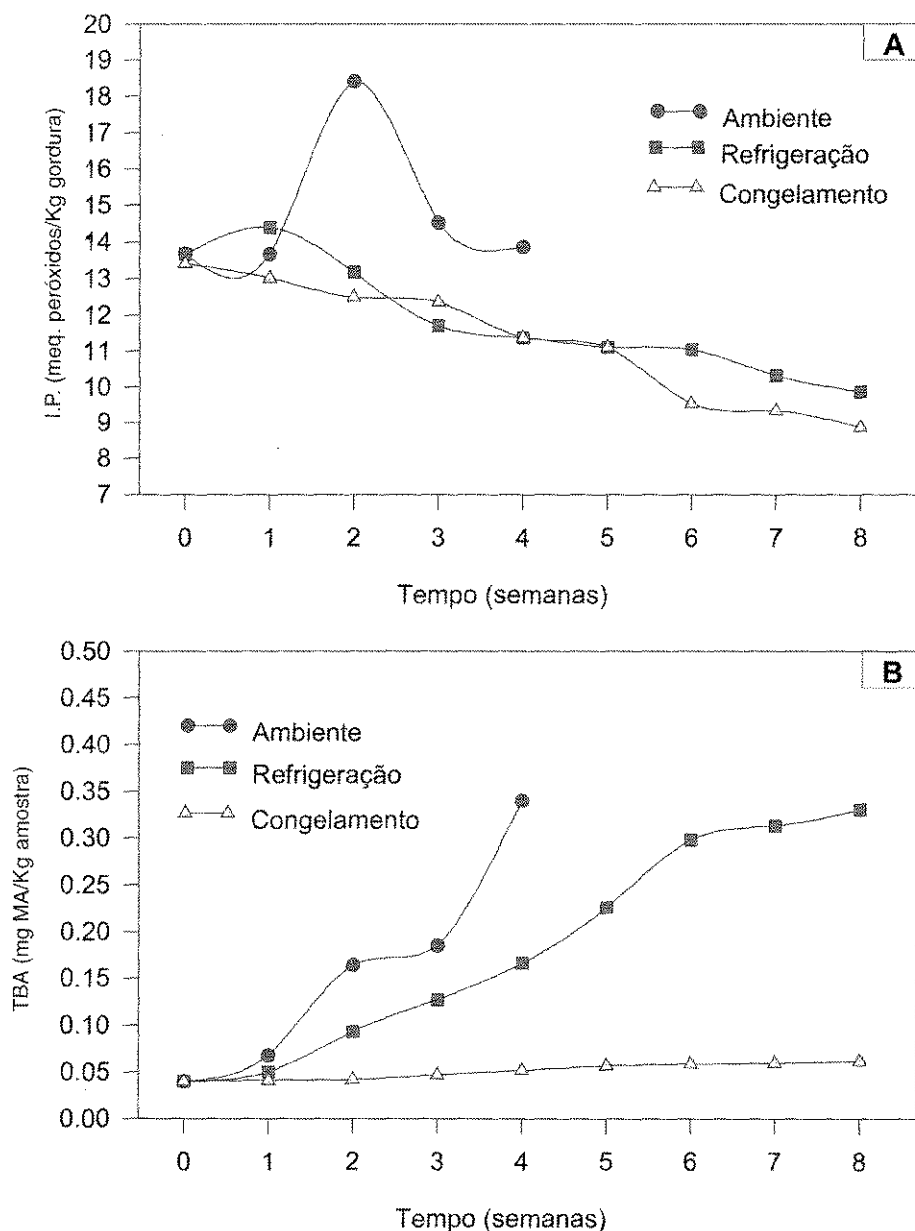


Figura 3 - Oxidação lipídica da anchova defumada durante armazenamento (A: Índice de peróxidos; B: Número de TBA)

Um estudo comparativo do processo oxidativo entre a defumação convencional e aquela com fumaça líquida foi executado por CUPPETT *et al.*<sup>11</sup> com filés de pescada contendo um teor de 5,9% de NaCl na fração aquosa, e estocado a 4 °C por 22 dias. A maior eficiência da fumaça líquida para inibir a rancidez oxidativa poderia estar relacionada com o método de aplicação da mesma, pois a melhor proteção obtida foi a dos filés submetidos a uma forte defumação (aplicação superficial),

enquanto que quando foi adicionada fumaça líquida na salmoura, foi observada pouca proteção superficial.

Segundo BELTRÁN & MORAL<sup>4</sup>, o armazenamento a -18 °C por 3 meses causou perda na proporção de ácidos graxos polinsaturados como: C20:5 (n-3) e C22:6 (n-3), o que foi regulado pelo fenômeno da oxidação e pôde ser atestado pelo aumento do I.P. (de 2,73 para 4,92 meq/Kg gordura ) e TBA (de 0,093 para 0,356 mg MA/Kg músculo).

Nas amostras de anchova defumada armazenada à temperatura ambiente (18,71 °C), observou-se a partir da primeira semana, um aumento do número de TBA e I.P., evidenciando o processo de oxidação lipídica. Entretanto, a partir da quarta semana, essa oxidação lipídica perdeu seu valor e uma deterioração microbiológica tornou-se mais evidente. A estocagem desse produto foi encerrada nesse período, visto que o produto já se encontrava em estado de deterioração avançado, verificado pelo odor pútrido.

A efetividade antioxidativa de alguns preparados de fumaça líquida quando aplicado ao alimento foi verificada em laboratório, em condições de estocagem a 40 °C. Os resultados indicaram que a fumaça líquida inibiu o desenvolvimento da rancidez do alimento gordo (porco defumado) durante 26 semanas de estocagem. Segundo HOLLENBECK<sup>18</sup>, o índice de peróxido passou de 0,8 meq/Kg gordura (controle e amostra com fumaça) para 43,1 (controle) e 3,2 (com fumaça).

MORAIS *et al.*<sup>27</sup> estudando a rancidez oxidativa em truta defumada com fumaça líquida, embaladas individualmente em sacos plásticos e estocada a -10 °C durante 150 dias, não observaram a oxidação através da reação de Kreis. Estes mencionam que antioxidantes naturais na fumaça líquida são eficazes e podem ter influenciado nesse resultado.

ZOTOS, HOLE & SMITH<sup>21</sup> verificaram uma alta concentração de hidroperóxidos (108 meq/Kg gordura) desenvolvida durante 33 semanas de armazenamento da cavala *in natura* sob congelamento (-20 °C) e que foi reduzida grandemente após o processo de defumação (10 meq/Kg gordura). Essa destruição dos hidroperóxidos durante a defumação indica que produtos secundários

foram produzidos, sendo os responsáveis pelos odores indesejáveis no produto processado, indicando uma diminuição na qualidade lipídica.

## CONCLUSÕES

- Foi obtido um produto defumado à base de anchova (*Pomatomus saltatrix*) utilizando aroma natural de fumaça, conhecido comercialmente por fumaça líquida;
- Uma pré-secagem a 49,5 °C por 45 minutos, antes da aplicação da fumaça líquida favoreceu uma maior penetração da mesma no músculo da anchova;
- O tratamento térmico em diferentes etapas (52,8 °C por 45 min.; 67 °C por 45 min.; e 80,8 °C por 2 h30 min.) foi suficiente para manter a estabilidade lipídica durante o processamento;
- Observou-se pouca evidência do processo oxidativo durante o processamento (identificada pelo baixo número de TBA), indicando que a oxidação lipídica poderia se encontrar no período de indução (que concorda com o aumento do índice de peróxidos);
- Os resultados de índice de peróxidos e número de TBA obtidos atestam a boa estabilidade do produto processado utilizando fumaça líquida armazenado por 60 dias à temperatura de -21,64 °C;
- O efeito antioxidante da fumaça líquida pôde ser verificado pelos baixos valores de índice de peróxidos e número de TBA ao longo do processamento e armazenamento.

GONÇALVES, A.A. & PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. - LIQUID SMOKING OF BLUE FISH (*Pomatomus saltatrix*): LIPID STABILITY DURING PROCESSING AND STORAGE. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 69-78, 1999.

**ABSTRACT:** The objective of this paper was evaluate possibles changes on lipid fraction of unskinned bluefish fillets during liquid smoking and in different conditions of storage. For the *in natura* bluefish used as raw material, and for the smoked product there were the following results of chemical composition: 69,38% and 59,79% of humidity; 1,09% and 2,45% of ash; 16,80% and 22,30% of protein; 12,43 and 15,21% of fat, respectively. As a parameter of lipid oxidation for the bluefish *in natura*, the following results of number of TBA and peroxide value, were gotten: 0,04 mg MA/Kg of muscle and 6,76 meq. peroxide/Kg of fat; and for the smoked bluefish: 0,06 mg MA/Kg of muscle and 8,84 meq. peroxide/Kg of fat. In relation to the samples stored under freezing (-21,64 °C), it was observed that the process of lipid oxidation did not present great importance during 60 days of storage. But the samples stored under refrigeration (5,74 °C) had a trend of lipid oxidation showed by the increase of TBA number. The samples stored at an environment temperature (18,71 °C) showed from the first week an increase of the TBA number and peroxide value, evidencing the process of lipid oxidation. However, from the fourth week (28 days) this lipid oxidation lost its value and a micro-biological deterioration became more evident (putrid smell).

**DESCRIPTORS:** bluefish, smoking, *liquid smoke*, lipid oxidation, stability

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADICON - Indústria e Comércio de Aditivos Ltda. *SMOKEZ - Peixes e Frutos do Mar (Defumação - Mariscos, peixes e alimentos marinhos)*. São Bernardo do Campo: ADICON Boletim Técnico, 7p, 1996.
2. ALOR, F.A.R. Caracterização e manejo do pescado destinado a salga e defumação. In: *Simpósio e Workshop: "Tecnologia de salga e defumação de pescado"*. Guarujá: ITAL, 1994a, p. 4-8.
3. AOAC - *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 16<sup>th</sup> ed, vol. II, chap. 35, Arlington, USA, 1995, p. 1-30.
4. BELTRÁN, A. & MORAL, A. Changes in fatty acid composition of fresh and frozen sardine (*Sardina pilchardus* W.) during smoking. *Food Chem.*, 42 (1): 99-109, 1991.
5. BERAQUET, N. J. & MORI, E.E.M. Influência de diferentes métodos de defumação na aceitabilidade de cavalinha *Scomber japonicus* Houtt defumada. *Col. do ITAL*, 14: 1-25, 1984.
6. BHUIYAN, A.K.M.A.; RATNAYAKE, W.M.N. & ACKMAN, R.G. Stability of lipids and polyunsaturated fatty acids during smoking of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.). *J. A. O. C. S.*, 63 (3): 324-328, 1986.
7. BLIGH, E.G.; SHAW, S.J. & WOYEWODA, A.D. Effects of drying and smoking on lipids of fish. In: Burt, J.R. *Fish Smoking and Drying: The effect of smoking and drying on the nutritional properties of fish.*, London: Elsevier Applied Science, 1988, p. 41-52.
8. CARECHE, M. & JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Oxidación de lípidios en pescado: Procedimientos de determinación. *Grasas y Aceites*, 39 (6): 387-396, 1988.
9. CLAUS, F. *Multilingual Illustrated Guide to the World's comercial warmwater fish*. Denmark: Scandinavian Fishing Year Book, Fishing News Book, 16<sup>o</sup> ed., 195, p.30-31.
10. CONTRERAS-GUZMÁN, E.S. *Bioquímica de pescados e derivados*. Jaboticabal: FUNEP, 1994, 409 p.
11. CUPPETT, S.L.; GRAY, J.I.; BOOREN, A.M.; PRICE, J.F. & STACHIW, M.A. Effect of processing variables on lipid stability in smoked great lakes whitefish. *J. Food Sci.*, 54 (1): 52-54, 1989.
12. CUTTING, C. L. Smoking. In: Borgström, G. *Fish as Food*. New York: Academic Press Inc., vol. III, part 1, chap. 2, 1965, p. 55-105.
13. FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A. Thiobarbituric acid

- test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem.*, 59 (3): 345-353, 1997.
14. GONÇALVES, A.A. Estudo do processamento da anchova, *Pomatomus saltatrix* (Pisces: Pomatomidae) utilizando aroma natural de fumaça. *Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos*. Rio Grande: FURG, 1998, 106 p.
  15. GUILLÉN, M. D.; MANZANOS, M. J. & IBARGOITIA, M. L. Ahumado de alimentos. Preparación, aplicación, métodos de estudio y composición de aromas de humo. *Alimentaria*, 274 (4): 45-53, 1996.
  16. HANSEN, L.T.; GILL, T. & HUSS, H.H. Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon. *Food Res. Int.*, 28 (2): 123-130, 1995.
  17. HARDY, R. Fish Lipids. Part 2. In: Connell, J.I. *Advances in Fish Science and Technology*. England: Fishing News Books Ltd., 1980, p. 103-111.
  18. HOLLENBECK, C.M. *Liquid smoke flavoring - Status of development*. Personal Communication, Manitowoc, Red Arrow Products Company, 1976.
  19. HORNER, B. Fish smoking: ancient and modern. *Food Sci. Technol. Today*, 6 (3): 166-171, 1992a.
  20. HORNER, W. F. A. Preservation of fish by curing (-drying, salting and smoking). In: Hall, G.M. *Fish Processing Technology*. New York: VCH Publishers, 1992b, p. 31-71.
  21. KARAKOLTSIDIS, P.A.; ZOTOS, A. & CONSTANTINIDES, S.M. Composition of the commercially important Mediterranean finfish, crustaceans and molluscs. *J. Food Comp. Anal.*, 8: 258-273, 1995.
  22. LAVETY, J.; STROUD, G.D.; HARDY, R.; WHITTLE, K.J. & KENT, M. *Nueva tecnología de procesamiento en la producción de salmón atlántico de cultivo*. Santiago: Fundación Chile, 1992, 32 p.
  23. MAGNÚSSON, H. & TRAUSTADÓTTIR, K. The microbial flora of vacuum packed smoked herring fillets. *J. Food Technol.*, 17 (6): 695-702, 1982.
  24. MAIA, E.L. Composição, conservação e utilização do curimatá, *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881. *Tese de Mestrado em Tecnologia de Alimentos*, Campinas: FEA - UNICAMP, 1980, 129 p.
  25. MILER, K.B.M. & SIKORSKI, Z.E. Smoking. In: Sikorski, Z.E. *Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation*. Boca Raton: CRC Press, chap. 10, 1990, p. 163-180.
  26. MORAIS, C. Princípios da defumação de pescado. In: *Simpósio e Workshop: "Tecnologia de salga e defumação de pescado"*. Guarujá: ITAL, 1994, p. 21-28.
  27. MORAIS, C.; MACHADO, T.M.; TAVARES, M.; TAKEMOTO, E.; YABIKU, H.Y. & MARTINS, M.S. Defumação líquida da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*): Efeitos do processamento e da estocagem nas propriedades físicas, químicas e sensoriais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (2): 43-48, 1996.
  28. OPSTVEDT, J. Influence of drying and smoking on protein quality. In: Burt, J.R. *Fish Smoking and Drying: The effect of smoking and drying on the nutritional properties of fish*. London: Elsevier Applied Science, 1988, p. 23-39.
  29. PSZCZOLA, D.E. Tour highlights production and uses of smoke-based flavors. *Food Technol.*, 4 (1): 70-74, 1995.
  30. RAMACHANDRAN, A. & TERUSHIGE M. Smoked salmon processing in Japan - A news approach. *Infofish Int.*, 4: 42-47, 1995.
  31. RAMÍREZ-SALDAÑA, A. R. Estudio tecnológico del ahumado de algunas especies marinas. *Informativo del Instituto del Mar del Perú*, 48: 1-30, 1978.
  32. SCHINDLER, J. Defumação - Nova Tecnologia. In: *Simpósio e Workshop: "Tecnologia de salga e defumação de pescado"*. Guarujá: ITAL, 1994<sup>a</sup>, p. 42-45.
  33. SCHINDLER, J. Defumação de peixes, mariscos e alimentos marinhos. In: *Simpósio e Workshop: "Tecnologia de salga e defumação de pescado"*. Guarujá: ITAL, 1994<sup>b</sup>, p. 46-50.
  34. SCHINDLER, J. Processo de defumação com um toque diferente. *Rev. Nac. Carne*, 241: 60-70, 1997.
  35. SINNHUBER, R.O. & YU, T.C. 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II - The quantitative determination of malonaldehyde. *Food Technol.*, 12 (1): 9-12, 1958.
  36. TANIKAWA, E. *Marine Products in Japan*. Tokyo: Koseisha Koseikaku Co. Ltd., 1985, p. 265-281.
  37. TORRES, E.A.F.S. & OKANI, E.T. Teste de TBA: Ranço em alimentos. *Rev. Nac. Carne*, 243: 68-78, 1997.

38. URRUTIA, A.P. Teoría del ahumado. In: *IX Curso Internacional de Tecnología de Processamiento de Productos Pesqueros*, ITP/JICA, 1993, p. 43-51.
39. WEINACKER, K. & BITTNER, S. Procesos de ahumado y cocción. *Alimentos*, 15 (3): 39-47, 1990.
40. WOOLFE, M.L. The effect of smoking and drying on the lipids of West African herring (*Sardinella spp.*). *J. Food Technol.*, 10 (5): 515-522, 1975.
41. ZOTOS, A.; HOLE, M. & SMITH, G. The effect of frozen storage of mackerel (*Scomber scombrus*) on its quality when hot-smoked. *J. Sci. Food Agric.*, 67: 43-48, 1995.

Recebido para publicação em 22/06/98



## DETECÇÃO E TIPAGEM DE VÍRUS DENGUE SOROTIPOS 1 E 2 POR MULTIPLEX RT-PCR

Maria Luisa BARBOSA\*

RIALA 6/855

BARBOSA, M.L. - Detecção e Tipagem de Vírus Dengue Sorotipos 1 e 2 por Multiplex RT-PCR. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 79-83, 1999.

**RESUMO:** Os vírus Dengue são arbovírus da família Flaviviridae, com 4 sorotipos antigenicamente distintos. Variações genéticas intraespecíficas entre os mesmos sorotipos, inclusive em uma mesma epidemia, estão bem estabelecidas. O desenvolvimento da técnica de polimerização em cadeia (PCR) é uma alternativa na identificação dos vírus Dengue. Neste estudo construímos dois novos pares de *primers* para os sorotipos 1 e 2, sem a ajuda de programas de computador. Foram utilizadas como modelo as seqüências genômicas de DEN-1 (Western Pacific), Nauru Island e DEN-2 New Guinea C. Os *primers* sense 5' ACA AAA AGT GGA GAC CTG GGC TC 3' (D1S) e complementar 5' GTC TAT TCC AAG TCT CTT GGG 3' (D1A) correspondem respectivamente às posições 769 a 791 e 1607 a 1587 do genoma do vírus DEN-1. Estas seqüências reconhecem parte das regiões de membrana (M) e proteína estrutural (E) do genoma do sorotipos 1 e contem 838 pares de bases. A seqüência de *primers* de DEN-2 foi 5' TGA AGG GGA CGG TTC TCC ATG T 3' (D2S) homólogos aos nucleotídeos 1838 a 1859 e 5' GAC TCC CAC CAA TAC TAG TGA CAC 3' (D2A) correspondendo às posições 2312 a 2288. O produto da amplificação foi de 474 pares de bases correspondendo a uma porção do genoma responsável pela síntese da proteína E. A especificidade dos *primers* foi avaliada por multiplex RT-PCR.

**DESCRITORES:** Dengue, RT-PCR Multiplex, *Primers*,

### INTRODUÇÃO

A introdução dos diversos sorotipos do vírus Dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4), em muitas regiões do mundo, vem ocorrendo devido à urbanização dos trópicos, ineficiência dos programas de saúde pública sobretudo no controle do vetor (mosquito) e em decorrência de problemas econômicos e sociais, vividos por países localizados em regiões propícias ao aparecimento do vetor e conseqüentemente do vírus responsável pela doença. A dengue é, mundialmente, a mais importante doença viral, transmitida por artrópodes, em termos de mortalidade e morbidade<sup>2,4</sup>.

O aperfeiçoamento de metodologias, para a detecção de vírus, se faz necessário não só para o diagnóstico,

como para a vigilância epidemiológica. Assim, para o diagnóstico do vírus Dengue, a utilização de técnicas de biologia molecular tem resultado no desenvolvimento de testes rápidos, sensíveis e específicos.

A técnica de polimerização em cadeia (Polymerase Chain Reaction- PCR)<sup>11,14</sup> é uma alternativa, na identificação dos vírus Dengue, pois em algumas horas pode-se obter grande quantidade do material genético de vírus, provenientes de amostras de soro, lesões teciduais ou culturas celulares infectadas com os vírus<sup>12</sup>. Este material pode, então, ser analisado por sequenciamento genômico, testes de hibridização, eletroforese em gel de agarose ou ainda por padrão de restrição enzimática<sup>6,13,7,1,9,10</sup>.

O teste de PCR envolve a escolha correta de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que se ligam especifi-

\* Instituto Adolfo Lutz - Av. Dr. Arnaldo, 355 - CEP 01246-902 - São Paulo SP - Brasil.

camente ao ácido nucléico que será amplificado. Os ciclos são repetidos e consistem de desnaturação do DNA, anelamento e extensão do *primer* pela DNA polimerase. Desta forma os oligonucleotídeos são fatores determinantes para o sucesso ou falha na amplificação do DNA.

Com a finalidade de identificar especificamente DEN-1 e DEN-2, em uma única etapa de PCR, construímos 2 pares de *primers* para estes sorotipos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os *primers* foram elaborados utilizando-se como molde as seqüências das linhagens Western Pacific (Nauru Island) para DEN-1<sup>8</sup> e New Guínea C para DEN-2<sup>3</sup> e gentilmente sintetizados pela Dra. Luíza L.Villa, do Instituto Ludwig de São Paulo. Foram analisadas as regiões do genoma correspondentes às proteínas de capsídio (C), pré membrana (prM), membrana (M) e envelope (E). Durante todo o estudo as seqüências dos 2 genomas foram comparadas fração a fração, nucleotídeos 410 a 2392 e 342 a 2345 para DEN-1 e DEN-2, respectivamente, e vários segmentos escolhidos como prováveis "primers". A elaboração destes oligonucleotídeos foi realizada sem a ajuda de programas de computador; as seqüências foram avaliadas e determinadas manualmente.

## RNA VIRAL

Os testes foram realizados com RNA viral purificados a partir dos 4 sorotipos de Dengue (provenientes do CDC), RNA padrão Gibco e água MilliQ como controle negativo. A especificidade dos "primers" foi analisada por multiplex RT-PCR.

## Síntese de cDNA

Os RNAs alvo (DEN-1, DEN-2 e controles) foram convertidos em cDNA (DNA cópia), a partir de uma fração de 5 µl de cada RNA diluído 1:100 em água e acrescentado 25 µl da mistura: 9,0 µl de H<sub>2</sub>O; 5,0 µl de tampão de enzima 5 vezes concentrado; 1,0 µl de RNasin a 10 U/µl; 3,0 µl de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM; 2,0 µl de DTT a 0,1 M; 0,5 µl de cada *primer anti-sense* (D1A e D2A) a 20 µM; 2,0 µl de dNTP a 10 mM; 2,0 µl de transcriptase reversa a 20 U/µl (RT - Superscript, GIBCO). A mistura foi incubada a 42 °C / 1 hora seguida de outra incubação a 95 °C/7 minutos.

## Amplificação do cDNA

A reação de polimerização em cadeia<sup>14</sup> foi realizada com 10 µl do produto contendo cDNA acrescido de 40 µl da mistura: 27,8 µl de H<sub>2</sub>O; 2,5 µl de tampão de enzima 10 vezes concentrado; 3,5 µl de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM; 1,0 µl de cada *primer sense* (D1S e D2S) e *anti-sense* (D1A e D2A) a 20 µM; 2,0 µl de dNTP a 10 mM; 0,2 µl de Taq DNA Polimerase a 5U/µl. Inicialmente a denaturação do cDNA-RNA híbrido foi feita à 94 °/5min. seguida de 35 ciclos com os seguintes passos: 94 °C/50seg. 50 °C/40seg. 72 °C/40seg. e 72 °C/7 minutos.

Após a amplificação, os produtos (5µl) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TAE (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA), o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV.

## RESULTADOS

Os "Primers" foram determinados por apresentarem conteúdo de C-G entre 45 e 55%, seqüências de bases com maior número de diferenças, entre os dois sorotipos em estudo, número máximo de bases inferior a 25 e temperatura de fusão (T<sub>m</sub>) semelhantes entre os 4 *primers* analisados. Observando-se estas características foram definidos os seguintes oligonucleotídeos.

D<sub>1</sub>S → 5'ACA AAA AGT GGA GAC CTG GGC TC 3'  
nucleotídeos 769 a 791, oligonucleotídeo *sense*

D<sub>1</sub>A → 5'GTC TAT TCC AAG TCT CTT GGG 3'  
nucleotídeos 1607 a 1587, oligonucleotídeos *anti-sense*

D<sub>2</sub>S → 5'TGA AGG GGA CGG TTC TCC ATG T 3'  
nucleotídeos 1838 a 1859 oligonucleotídeo "sense".

D<sub>2</sub>A → 5'GAC TCC CAC CCA ATA CTA GTG ACAC 3'  
nucleotídeos 2312 a 2288 oligonucleotídeo não "sense".

O tamanho da seqüência do DNA amplificado foi consistente com o esperado para a região alvo do genoma dos vírus DEN-1 e DEN-2, os fragmentos resultantes correspondem a 838 pares de bases para o sorotipo 1 e 474 para o sorotipo 2 (Figuras 1).

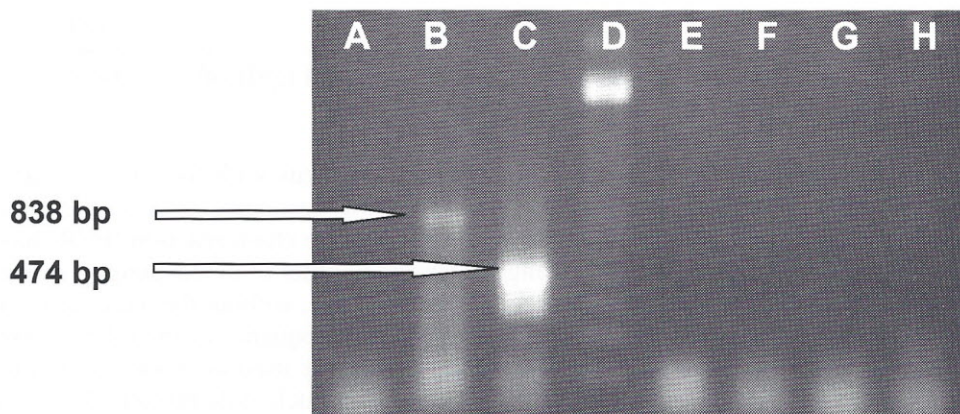


FIGURA 1: Gel de agarose empregado na análise dos produtos de RT-PCR dos Genomas padrões de vírus Dengue: (a) reagentes; (b) DEN-1; (c) DEN-2; (d) padrão peso molecular 100 bp ladder GIBCO BRL; (e) DEN-3; (f) DEN-4; (g) RNA controle; (h) H<sub>2</sub>O controle.

## DISCUSSÃO

O desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem facilitado o diagnóstico e detecção dos vírus Dengue. Uma das principais considerações nos protocolos de PCR está na obtenção de produtos específicos determinados pelos “primers”.

Embora a padronização da PCR envolva muitas variáveis, um dos parâmetros mais críticos, em todos os casos, é a obtenção de “primers”, que se ligam especificamente ao ácido nucléico em estudo, resultando em produtos específicos. Assim a etapa fundamental na construção de um “Primer”, é assegurar esta especificidade.

Relatos anteriores têm descrito que a mistura de “primers” específicos possibilita a amplificação dos vírus Dengue, usando técnicas de hibridização, “Nested” ou ainda amplificação de parte do genoma após a digestão com enzimas de restrição. A utilização destes novos “primers” permitiu a amplificação do cDNA em uma única etapa.

A tipificação em uma etapa de PCR, reduz sensivelmente o risco de contaminação, pois neste processo não é necessária a manipulação de cDNA amplificado inter-

mediário. Esta simplificação representa uma vantagem sobre o método empregando “nested” cujos resultados são obtidos após uma segunda etapa de amplificação e hibridização que requer sonda marcada, purificada e padronizada, às vezes de difícil reprodução.

A especificidade de nossos “primers” foi revelada por sua habilidade em reconhecer seqüências específicas únicas de RNA de cada um dos sorotipos 1 e 2, não se observando qualquer cruzamento entre os 2 sorotipos em estudo e completa ausência de amplificação com os sorotipos 3 e 4. Somente um produto foi obtido em cada reação de tipificação.

Variações genéticas intraespecíficas entre as viroses por dengue, mesmo em áreas epidêmicas, estão bem estabelecidas<sup>15</sup>. Desta forma o sucesso obtido na amplificação dos vírus Dengue sorotipos 1 e 2 isolados, em culturas celulares, representa a perspectiva para que em um futuro próximo esta metodologia possa ser utilizada em amostras de soro de pacientes, permitindo um diagnóstico, além de específico, mais rápido e sensível na detecção dos vírus circulantes em nosso meio.

BARBOSA, M.L. - Multiplex RT-PCR used for detection and tipification of Dengue viruses serotypes 1 and 2. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 79-83, 1999.

**ABSTRACT:** Dengue Virus is a mosquito-borne flavivirus with four antigenically distinct serotypes. Intratypic genetic variation among the virus serotypes, even in the same epidemic, is well established. The development of the polymerase chain reaction (PCR) has facilitated the diagnostic assays in detecting dengue viruses. In order to detect dengue viruses circulating in Brazil, two new pairs of type-specific primers were, without the aid of any computer program, manually designed. We used as model genomic sequence of the DEN-1 (Western Pacific strain), Nauru Island and DEN-2, New Guinea C were used as model. The genomic-sense, 5' ACA AAA AGT GGA GAC CTG GGC TC 3', oligonucleotide primers (D1S) and the 5' GTC TAT TCC AAG TCT CTT GGG 3' (D1A) oligonucleotide complementary to the plus-strand corresponded respectively to the positions 769 to 791 within 5' non coding region of the DEN-1 virus genome and 1607 to 1587. These primer sequences bracketed at 838 nucleotides base sequence in the M and E gene. The sequence sense primers of DEN-2 was 5' TGA AGG GGA CGG TTC TCC ATG T 3' (D2S) homologous to nucleotides 1838 to 1859 and the 5' GAC TCC CAC CAA TAC TAG TGA CAC 3' (D2A) oligonucleotide used for the first-strand cDNA synthesis was designed to contain complementary sequences to the original RNA at 3' end, corresponding to positions 2312 to 2288. The amplification product has a 474bp size corresponding to E gene portion. The primer specificity were evaluated by the multiplex RT-PCR.

**DESCRIPTORS:** Dengue, Multiplex RT-PCR, Primers.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHANDLER, L.J.; BLAIR, C.D. & BEATY, B.J. Detection of Dengue-2 viral RNA by reversible target capture hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, **31**: 2641-2647, 1993.
2. GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever In: *The Americas. Puerto Rico Health Sci. J.* **6**: 107-111, 1987.
3. GRUENBERG, A.; WOO, W.S.; BIEDRZYCKA, A. & WRIGHT, P.J. Partial nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the structural proteins of dengue type 2, New Guinea C and PVO-218 strains. *J. Gen. Virol.* **69**: 1391-1398, 1988.
4. HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology- *Science*, **239**: 476- 481, 1988
5. HENCHAL, E.A.; GENTRY, M.K.; McCOWN, J.M. & BRANDT, W.E. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **31**: 830-836, 1982.
6. HENCHAL, E.A.; POLO, S.L.; VOMDAM, V.; YAAEMSERI, C.; INNIS, B.L. & HOKE, C.H. Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **45**: 418-428, 1991.
7. LANCIOTTI, R.S.; CALISHER, C.H.; GUBLER, D.J. & VORNDAM, A.V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **3**: 545-551, 1992.
8. MASON, P.W.; McADA, P.C.; MASON, T.L. & FOURNIER, M.J. Sequence of the Dengue-1 virus genome in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural proteins NS1. *Virology*, **161**: 262-267, 1987.
9. MORITA, K.; MAEMOTO, T.; HONDA, S.; ONISHI, K.; MURATA, M.; TANAKA, M. & IGARASHI, A. Rapid detection of virus genome from imported dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients by direct polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*, **44**: 54-58, 1994.
10. MORITA, K.; TANAKA, M. & IGARASHI, A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **29**: 2107-2110, 1991.

11. MULLIS, K.B. & FALOANA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** **155**: 335-350, 1987.
12. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for prevention and control. Washington, D.C.: PAHO, 1994.
13. PURI, B.; HENCHAL, E.A.; BURANS, J.; PORTER, K.R.; NELSON, W.; WATTS, D.M. & HAYRS, C.G. A rapid method for detection and identification of flaviviruses by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. **Arch. Virol.**, **134**: 29-37, 1994.
14. SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, A.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, **239**: 487-491, 1988.
15. TRENT, D.W.; MANSKE, C.L.; FOX, G.E.; CHU, N.C.; KLIKIS, S.C. & MONATH, T.P. The molecular epidemiology of dengue viruses: Genetic variation and microevolution. **Appl. Virol. Res.**, **2**: 293-315, 1990.

Recebido para publicação em 04/08/98

## AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE PASTEURIZADO COMERCIALIZADO NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

Cecília Cristina Marques dos SANTOS \*  
Jacqueline Tanury Macruz PERESI \*  
Maria do Rosário Vigeta LOPES \*  
Sônia Isaura de LIMA \*  
Inara Siqueira de CARVALHO \*  
Odair ZENEBOB \*\*

RIALA 6/856

SANTOS, C.C.M. ;PERESI, J.T.M.; LOPES, M.R.V. LIMA, S.I.; CARVALHO, I.S. & ZENEBOB, O. - Avaliação microbiológica e físico-química do leite pasteurizado comercializado na Região de São José Do Rio Preto – SP. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 85-89, 1999.

**RESUMO:** Com o propósito de avaliar a qualidade do leite pasteurizado e comercializado na região de São José do Rio Preto, no período de 05.92 a 09.97 foram analisadas 511 amostras de leite dos tipos A, B, C e desnatado, quanto ao aspecto microbiológico e às características físico-químicas. Na análise microbiológica foram determinados NMP de coliformes totais, NMP de coliformes fecais, contagem padrão em placas e presença/ausência de *Salmonella*, segundo a metodologia recomendada pela APHA e as análises físico-químicas pelos métodos oficiais exigidos pela legislação vigente (Ministério da Agricultura e Normas Analíticas do IAL). Das amostras analisadas 232 (45,4%) estavam em desacordo com os padrões legais vigentes, sendo 131 (25,6%) quanto à análise microbiológica e 128 (25,0%) quanto à físico-química. Os resultados das análises microbiológicas mostraram que 94 (18,4%) amostras de leite pasteurizado (principalmente no tipo C) estavam acima do limite máximo preconizado para coliformes totais. Os coliformes fecais, representaram 12,9% das condenações, com maior incidência também no leite tipo C. Na análise físico-química foram efetuadas as determinações de acidez, gordura, extrato desengordurado, extrato seco total, índice crioscópico, substâncias oxidantes e conservantes, provas de fosfatase e peroxidase. As alterações físico-químicas que ocorreram foram principalmente em relação a prova de peroxidase onde 55 (10,8%) amostras analisadas apresentaram indícios de que a pasteurização estava fora da temperatura adequada e 148 (29,0%) apresentaram pelo menos um parâmetro físico-químico alterado, sendo o mais freqüente o índice crioscópico, indicando adição de água ou problemas tecnológicos na pasteurização ou desodorização do leite. Apenas 1 (uma) amostra apresentou reação positiva para substâncias oxidantes. Das amostras analisadas, 232 (45,4%) apresentaram padrões de qualidade e higiene insatisfatórios, indicando a necessidade de fiscalização e controle permanentes do leite pasteurizado.

**DESCRITORES:** Leite pasteurizado, Controle de qualidade, Saúde Pública.

\* Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de São José do Rio Preto .

\*\* Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Central - São Paulo Autor para Correspondência :Cecília Cristina Marques dos Santos — Rua Alberto Sufredine, 2325- Maceno - São José do Rio Preto -SP — CEP. 15060-020.

## INTRODUÇÃO

A finalidade da Vigilância Sanitária é garantir, por suas ações, que os produtos destinados ao consumo humano mantenham nível de qualidade tal que elimine ou minimize a probabilidade de ocorrência de efeitos danosos à saúde.<sup>12</sup>

A Vigilância Sanitária dentro do contexto de Saúde Pública deve desencadear ações capazes de prevenir riscos à saúde do consumidor. Neste sentido, e considerando que o leite é um alimento importante, qualitativamente o mais completo e de amplo consumo por indivíduos de todas as faixas etárias, sua qualidade deve ser periodicamente avaliada por órgãos competentes em Saúde Pública.

Para garantir a qualidade e assegurar condições higiênicas satisfatórias, as usinas de beneficiamento devem seguir as normas preconizadas desde a ordenha até a conservação do leite pasteurizado.<sup>3,13,14</sup>

A pasteurização não renova um leite alterado, mas é um recurso de natureza industrial para prevenir e retardar a sua deterioração. No processo de pasteurização, "temperatura" e "tempo" são estabelecidos de maneira a eliminar principalmente microrganismos patogênicos, ocasionando alteração mínima na composição química intrínseca do leite.<sup>3</sup>

Contudo, é um produto que muitas vezes apresenta problemas de qualidade, tanto no aspecto microbiológico, como no físico-químico.<sup>8</sup>

Com o propósito de avaliar a qualidade do leite pasteurizado e comercializado na região de São José do Rio Preto(SP), no período de maio/92 a setembro/97 foram analisadas 511 amostras de leite dos tipos A, B, C e desnatado, quanto ao aspecto microbiológico e às características físico-químicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

As 511 amostras de leite pasteurizado tipos A, B, C e desnatado foram coletadas no comércio varejista de São José do Rio Preto (SP) e região pelo Grupo Técnico de Vigilância Sanitária da Divisão Regional de Saúde (DIR XXII) para procedimento de análise fiscal. Foram tomadas assepticamente alíquotas de 100 mL para o exame microbiológico e, após a medida do volume restante e avaliação das suas características organolépticas, a amostra foi submetida aos exames físico-químicos.

Na análise microbiológica foram determinados Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais, contagem padrão em placas e presença/ausência de *Salmonella*, segundo a metodologia recomendada pela APHA<sup>1</sup>. Apesar dos estafilococos coagulase positiva não constarem nos padrões microbiológicos da

Portaria n.º 01 de setembro de 1987<sup>4</sup>, 167 (32,7%) amostras de leite foram submetidas a esse teste, sendo a determinação quantitativa realizada pela técnica de tubos múltiplos, série de 3, com determinações do NMP.<sup>15</sup>

As análises físico-químicas foram realizadas pelos métodos oficiais (Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz e Ministério da Agricultura)<sup>5,6,11</sup> e determinados os seguintes parâmetros: Acidez (em graus Dornic), densidade a 15 °C, pelo termolactodensímetro de Quevene e gordura pelo butirômetro de Gerber, extrato seco total e extrato seco desengordurado. O índice crioscópico foi determinado através de crioscópio (Laktron-M 90) digital. As provas de peroxidase e fosfatase foram efetuadas para verificar se houve alteração pelo aquecimento (temperatura superior a 75 °C) e a eficiência da pasteurização respectivamente<sup>3,17</sup>. Para verificar a presença de conservadores foram empregados: solução de carmim (para a detecção de ácido bórico), solução de guaiacol a 1% m/v para detecção de água oxigenada e ácido sulfúrico (1+1)v/v e cloreto férrico 1% m/v para detecção de formaldeído. Para determinação de ácido salicílico e salicilatos utilizou-se ácido clorídrico (1+3)v/v como precipitante, éter etílico e solução de cloreto férrico a 0,5% m/v como reagente cromogênico. Substâncias oxidantes foram determinadas mediante o uso de solução sulfúrica de difenilamina.<sup>11</sup>

## RESULTADOS

Das 511 amostras analisadas, 232 (45,4%) estavam em desacordo com os padrões legais vigentes, sendo 131 (25,6 %) quanto ao exame microbiológico e 128 (25,0%) quanto ao físico-químico, conforme demonstrado na Tabela 1 e Tabela 2. A distribuição dos resultados microbiológicos em desacordo com a legislação vigente<sup>1</sup> segundo os parâmetros e tipos de leite estão relacionados na Tabela 1.

Não foi isolada *Salmonella* em nenhuma das amostras analisadas.

Das 167 amostras de leite pasteurizado que foram submetidas a pesquisa de estafilococos coagulase positiva, 24(14,4%) apresentaram resultado positivo assim distribuídos: 01 amostra de leite pasteurizado tipo A (4,2%), 05 de tipo B (20,8%), 16 de tipo C (66,7%) e 02 de desnatado (8,3%). A variação do número de estafilococos coagulase positiva obtida por NMP de acordo com o tipo de leite foi: tipo A (0,36/mL); tipo B (de 0,3 a 9,3/mL); tipo C (de 0,3 a 4,4/mL) e tipo desnatado (de 0,76 a 2,1/mL).

A Tabela 2 mostra os parâmetros físico-químicos que apresentaram maior número de alterações. Apenas uma amostra apresentou reação positiva para substâncias oxidantes. E quanto as características organolépticas apresentaram-se normais em todas as amostras analisadas.

TABELA 1  
AMOSTRAS DE LEITE PASTEURIZADO EM DESACORDO COM OS PADRÕES BACTERIOLÓGICOS ESTABELECIDOS PELA LEGISLAÇÃO — MAIO DE 1992 A SETEMBRO DE 1997

TIPOS DE LEITE	AMOSTRAS ANALISADAS	PADRÕES BACTERIOLÓGICOS			AMOSTRAS EM DESACORDO
		CONTAGEM PADRÃO	COLIFORMES TOTAIS	COLIFORMES FECAIS	
A	38	02(5,3%)	04(10,5%)	02(5,3%)	04(10,5%)
B	97	16(16,5%)	26(26,8%)	18(18,6%)	40(41,2%)
C	309	11(3,6%)	45(14,6%)	39(12,6%)	65(21,0%)
DESN.	66	15(22,7%)	19(28,8%)	07(10,6%)	22(33,3%)
TOTAL	511	44(8,6%)	94(18,4%)	66(12,9%)	131(25,6%)

TABELA 2  
AMOSTRAS DE LEITE PASTEURIZADO EM DESACORDO COM OS PADRÕES FÍSICO-QUÍMICOS ESTABELECIDOS PELA LEGISLAÇÃO — MAIO DE 1992 A SETEMBRO DE 1997

TIPOS DE LEITE	AMOSTRAS ANALISADAS	PADRÕES FÍSICOS				AMOSTRAS EM DESACORDO
		ACIDEZ	ÍNDICE CRIOSCÓPICO	PEROXIDASE	EXTRATO SECO TOTAL	
A	38	4(10,5%)	29(76,3%)	9(23,7%)	6(15,8%)	19(50%)
B	97	6(6,2%)	57(58,8%)	14(14,4%)	8(8,2%)	25(25,8%)
C	309	18(5,8%)	132(42,7%)	30(9,7%)	3(1,0%)	71(23,0%)
DESN.	66	3(4,5%)	34(51,7%)	2(3,0%)	2(3,0%)	13(20,0%)
TOTAL	511	31(6,0%)	252(49,3%)	55(10,8%)	19(3,7%)	128(25,0%)

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As alterações físico-químicas ocorreram principalmente em relação a prova de peroxidase, apresentando indícios de que a temperatura de pasteurização estaria fora da adequada, pois esta enzima é inativada quando o leite é submetido a temperaturas superiores às indicadas para a pasteurização e nestas condições o leite está em desacordo com o padrão enzimático previsto na legislação vigente e não deverá ser empregado na fabricação de derivados.<sup>3,5,17</sup>

Das amostras analisadas, 252 (49,3%) apresentaram índice crioscópico alterado indicando fraude por molhagem, problemas tecnológicos ou desodorização do leite.<sup>3,17</sup>

Os resultados obtidos através da análise microbiológica mostraram que 25,6% das amostras estavam fora dos padrões legais vigentes. A má higienização dos equipamentos, as falhas no processo de pasteurização e a manutenção do produto em temperatura superior a indicada pelo R.I.I.S.P.O.A<sup>7</sup>, tanto no laticínio, quanto no transporte ou comércio, constituem as grandes causas das altas contagens bacterianas encontradas<sup>10</sup>. A possível contaminação do produto com microrganismos enteropatógenicos, revelado pela presença de coliformes fecais acima dos limites estabelecidos pela legislação<sup>4</sup> em 12,9% das amostras analisadas serve de alerta ao risco que a população está sujeita ao consumir leite pasteurizado. Cabe lembrar que a pasteurização do leite foi estabelecida para melhorar suas qualidades nutricionais evi-



tando exposição ao calor excessivo da fervura e eliminando os microrganismos patogênicos acaso presentes.

O leite pela sua composição, torna-se um meio de cultura natural, oferecendo condições excelentes para a multiplicação de microrganismos<sup>9, 10, 16</sup>. Estafilococos coagulase positiva tem sido responsável por alta incidência de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA). O presente estudo revelou que em 14,4% das 167 amostras de leite pasteurizado analisadas foi encontrada essa bactéria.

O fato de possíveis falhas no processo de pasteurização e de que, após a distribuição do leite em alguns pontos de venda, o mesmo ficar muitas vezes em temperatura ambiente por um período de tempo considerável antes de ser adequadamente acondicionado, esse leite torna-se sujeito à proliferação de estafilococos coagulase positiva entre outras bactérias, podendo assim liberar quantidade suficiente de enterotoxinas estafilocócicas (termoestáveis) capazes de provocar episódios de ETA.

Diante desta realidade sugerimos a inclusão desta determinação nos padrões microbiológicos do leite pasteurizado, complementando os padrões existentes na

Portaria 451 de 19 de setembro de 1.997, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde<sup>4</sup>.

O conjunto dos resultados obtidos no presente artigo, mostrou a necessidade de que profissionais ligados a produção, implantem em sua prática diária, ações voltadas à melhoria da qualidade do leite pasteurizado oferecido à população.

Na atualidade o instrumento mais avançado para proteger os produtos alimentícios de perigos microbiológicos, físicos e químicos é o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (HACCP). Com base científica, o sistema tem por finalidade identificar perigos específicos e estabelecer medidas preventivas de controle em toda a cadeia alimentar, envolvendo a produção primária, as indústrias, os transportadores, os consumidores, os inspetores e fiscalizadores e os fornecedores de produtos e serviços de qualquer natureza que se relacione com a segurança do alimento<sup>2</sup>.

Além das ações do fabricante, é essencial uma fiscalização mais efetiva nos laticínios e também nos pontos de venda, onde órgãos competentes em vigilância sanitária devem agir visando maior proteção à saúde pública.

RIALA 6/856

SANTOS, C.C.M.; PERESI, J.T.M.; LOPES, M.R.V. LIMA, S.I.; CARVALHO, I.S. & ZENEON, O. - MICROBIOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL EVALUATION OF THE PASTEURIZED MILK TRADED IN THE REGION OF SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-SP. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 85-89, 1999.

**ABSTRACT:** With the purpose to evaluate the quality of the pasteurized milk commercialized in the region of São José do Rio Preto, from May, 1992 to August, 1997, 511 samples of types A, B, C and skimmed milk were analysed concerning the microbiological and physicochemical standards. In the microbiological analysis the MPN of coliform group, MPN of fecal coliforms standard plate count and presence/absence of *Salmonella* were determined, according to the recommended methodology by APHA and the physicochemical analysis by the official methods requested by the current legislation (Brazilian Ministry of Agriculture and Analytical Norms of IAL). From the analysed samples 232 (45,4%) were not in accordance with the current legal standards, being 131 (25,6%) related to the microbiological analysis and 128 (25,00%) to the physicochemical. The results of the microbiological analysis showed that 94 (18,4%) samples of pasteurized milk (mainly C type) were above the accepted level of coliform group. The fecal coliforms, represented 12,9% of the condemnations, with a higher incidence also in the type C milk. In the physicochemical analysis were carried out the determinations of acidity, fat, fatless extract, total dry extract, freezing point, oxidating and preservatives, phosphatase and peroxidase proofs. The physicochemical changes that occurred were mainly related to the peroxidase proof, were 55 (10,8%) samples analysed showed indication that the pasteurization was out of the adequate temperature and 148 (29,00%) showed at least one altered physicochemical standard, being the freezing point most frequent, indicating water addition or technological problems in the pasteurization. Only one sample showed a positive reaction for oxidating substances. From the analysed samples, 232 (45,4%) showed no satisfactory standards of quality and hygiene, indicating the need of permanent quality control of the pasteurized milk.

**DESCRIPTORS:** pasteurized milk, quality control, Public Health.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - *Standard methods for the examination of dairy products*. 15th ed. Washington, D.C., p. 133; 173, 1985.
2. INSTITUTO ADOLFO LUTZ - *Aplicação do Sistema HACCP - Apostila datilografada* - São Paulo, 1997.
3. BEHMER, M.L.A., *Tecnologia do leite*, 15ª, São Paulo, Nobel, 1991. p.320.
4. BRASIL, Leis, decretos, etc. Portaria n.º 01 de 28 de janeiro de 1987, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. (Aprova os padrões microbiológicos para os produtos expostos à venda ou de alguma forma destinados ao consumo..) - *Diário Oficial*, Brasília, de 12 de fevereiro de 1987, Seção I, p.2197.
5. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (aprovado pelo Decreto 30.691 de 28.03.52, alterado pelo Decreto 1.255 de 25.06.62), *Ministério da Agricultura*, p.92;126 - Brasília, 1980.
6. 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. II - Métodos físicos e químicos*, p.XIV-10 - Brasília, 1981.
7. BRASIL. Ministério da Agricultura - Departamento Nacional de Produtos de Origem Animal - *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*-R.I.I.S.P.O. •A• Aprovado pelo decreto n.º 30.691 de 29 de março de 1.952, alterado pelo decreto n.º 1.255 de 25 de junho de 1.962, 174p., Rio de Janeiro, 1962.
8. GARRIDO, N.S.; MARTINS, A.M.B.; RIBEIRO, E.G.A.; FARIA, R.D.; YOKOSAWA, C.E.; OLIVEIRA, M.A. ; FÁVARO,R.M.D. - Condições físico-químicas e higiênico-sanitárias do leite pasteurizado tipos "C" e "B" e integral comercializados na Região de Ribeirão Preto - SP - *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, 56 (2): 65-70, 1996.
9. GONÇALVES,R.M.S.;FRANCO,R.M.- Determinação da carga bacteriana em leite pasteurizado tipo "B" e "C", comercializados na cidade do Rio de Janeiro, RJ. *Higiene Alimentar*, 12 (53): 61-65, 1998.
10. HOFFMANN,F.L.; CRUZ,C.H.G.; VINTURIM,T.M. - Estudo higiênico-sanitário do leite tipo "B" comercializado na Região de São José do Rio Preto - SP. *Higiene Alimentar*, 9(37):24-27,1995.
11. INSTITUTO ADOLFO LUTZ-*Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, vI. Métodos químicos e físicos para a análise de alimentos*. 3ªed.São Paulo, 1985. p.199-225.
12. MOREIRA LIMA,L.F. - *Vigilância Sanitária de Medicamentos e Correlatos* - Rio de Janeiro, Qualitymark editora, 1993,p.1-17.
13. PANETTA, J. C.; BARROS, V.R.M.; PANETTA, S. - Leite "B" perspectiva para um padrão nacional. *Higiene Alimentar*, v.5, n.º 18, p.24-27, junho /1991.
14. PENNA, T.C.V.; BARUFFALDI, R.; COLOMBO, A.J. - Estudos das condições higiênico-sanitárias e das características físico-químicas do leite pasteurizado teor de gordura 3,2% m/v, vendido na cidade de São Paulo - *Ciência e Tecnologia Alimentos*, 6(1):57-74, 1986.
15. PERESI, J.T.M.; KAKU,M.; GELLI, D.S.; LIMA, S.I.; DUARTE, V.L.S. - Comparação entre os caldos de enriquecimento "Tryptic Soy" com 10% de cloreto de sódio e Giolitti - Cantoni usados na determinação de estafilococos coagulase positiva em alimentos - *Rev. Instituto Adolfo Lutz* .56(1):83-86, 1996.
16. SILVEIRA,N.V.V.; SAKUMA, H.; DUARTE, M.; RODAS, M.A.B.; SARYWTARI, J.H.; CHICOUREL, E.L. - Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. *Rev. Instituto Adolfo Lutz*, 49(1):19-25, 1989.
17. WEBB, B.H.; JOHNSON, A.H.; ALFORD,J.A. - *Fundamentals of Dairy Chemistry*, 2º ed., Westport, The Avi publishing Company, Inv, 1980, p.929.

Recebido para publicação em 29/04/98

ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA DE ANFETAMINAS E BENZODIAZEPINAS EM FORMULAÇÕES PARA EMAGRECIMENTO. ESTUDO I: DETERMINAÇÃO DE DIETILPROPIONA E FEMPROPOREX

Luz Marina TRUJILLO\*  
Maria Auxiliadora CHAVES\*  
Amélia Shioko AKATUKA\*  
Maria Helena IHA\*\*

RIALA 6/857

TRUJILLO, L.M.; CHAVES, M.A.; AKATUKA, A.S. & IHA, M. H. - Análise por Cromatografia Gasosa de Anfetaminas e Benzodiazepinas em Formulações para Emagrecimento. Estudo I: Determinação de Dietilpropiona e Femproporex. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 91-96, 1999.

**RESUMO:** Este trabalho descreve o estudo de um método de análise por cromatografia gasosa para determinação simultânea de dietilpropiona e femproporex presentes em formulações indicadas para regime de emagrecimento. Este método foi aplicado em 03 (três) fórmulas diferentes, constituídas de fármacos em quantidades que variam dentro da faixa mais comumente prescrita. O método consistiu da extração dos fármacos com diclorometano em meio alcalino, seguida da análise por cromatografia gasosa usando a fenilpropanolamina como padrão interno. Foi observada a separação das substâncias, dietilpropiona e femproporex, com tempo de retenção de 3,7 e 4,3 minutos, respectivamente. O coeficiente máximo de variação do método para dietilpropiona foi 2,28% e para femproporex 2,41%.

**DESCRITORES:** Cromatografia gasosa; dietilpropiona; femproporex; formulações para regime de emagrecimento.

### INTRODUÇÃO

As formulações para regime de emagrecimento, comumente utilizadas no tratamento da obesidade, são consumidas de forma abusiva por certos indivíduos. O uso indevido destas formulações demanda de prescrições médicas incorretas<sup>10</sup> (associação não recomendada dos princípios ativos ou quantidade excessiva dos mesmos), período de tratamento prolongado e, abuso de drogas, como, por exemplo, a automedicação. A saúde dos pacientes ficará seriamente comprometida pelos danos ocasionados quando da utilização indiscriminada dos chamados produtos "moderadores de apetite". Decorre-se, então, o grande empenho de profissionais da Saúde, preocupados com a ação eficaz e segura destes produtos

farmacêuticos<sup>8</sup>, no desenvolvimento de métodos analíticos que assegurem a qualidade dos mesmos.

Aos dezenove de Maio de 1998, a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde publicou a Portaria nº 344, que no Artigo 48 resolve o seguinte: "Proibir, em todo Território Nacional, a fabricação, dispensação e comercialização de associações medicamentosas, contendo em sua formulação as substâncias: dietilpropiona ou anfepramona, d-fenfluramina, d,l-fenfluramina, femproporex e mazindol, quando associadas entre si e /ou a outras substâncias de ação no sistema nervoso central (inclusive as benzodiazepinas) e/ou substâncias com ação no sistema endócrino"<sup>3</sup>.

Dentre as anfetaminas citadas na Portaria nº. 344/98, as mais comumente prescritas são dietilpropiona

\* Seção de Química Farmacêutica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo SP.

\*\* Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Ribeirão Preto.

e femproporex, na forma de cloridrato, associadas entre si e/ou com ansiolíticos, diuréticos e laxativos.

Os princípios ativos dietilpropiona e femproporex são substâncias anorexígenas que atuam, em nível de sistema nervoso central, com ação de supressão do apetite<sup>6, 9, 12</sup> e da sensação de fome<sup>9, 12</sup>. O uso de anfetaminas deve ser rigorosamente controlado por serem consideradas drogas de abuso, causando dependência física e psíquica<sup>1, 6, 9, 11</sup>; os efeitos adversos constituem desde pequenos agravos à saúde, como leves transtornos gastro-intestinais, até reações capazes de provocar danos irreversíveis, como colapso circulatório e morte, no caso de super-dosagem<sup>9</sup>.

Vistos tais aspectos, tornou-se de suma importância o desenvolvimento de um método analítico de separação e determinação do teor de anfetaminas em quaisquer formulações farmacêuticas para avaliar a qualidade dos produtos consumidos durante o tratamento da obesidade.

CHAVES et al<sup>4</sup> apresentou um método analítico para determinação quantitativa de dietilpropiona, fem-

proporex, diazepam e fenolftaleína, constituintes de uma única formulação. Porém, a dietilpropiona e o femproporex não foram identificados separadamente, somente na totalidade, por procedimentos volumétricos e espectrofotométricos.

O presente trabalho tem por objetivo descrever um método de análise por cromatografia gasosa que permita separar e quantificar dietilpropiona e femproporex, simultaneamente, em presença de diazepam.

## MATERIAL E MÉTODO

O método analítico estudado foi aplicado em 03 (três) fórmulas diferentes, constituídas de princípios ativos em quantidades que variam dentro da faixa mais comumente prescrita, sendo, estas fórmulas, manipuladas pelos autores no laboratório.

As três fórmulas estudadas estão apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1

Quantidade (em miligramas) dos princípios ativos segundo a fórmula

Princípio ativo	Fórmula (mg)		
	A	B	C
Dietilpropiona, cloridrato	75	50	25
Femproporex, cloridrato	40	20	10
Diazepam	5	5	5
Excipiente q.s.p.	200	150	100

Nota: as substâncias utilizadas como excipientes foram sulfato de sódio e talco (para análise), guardada a proporção 1:1.

### Equipamentos

Cromatógrafo à gás com detector de ionização de chama - CG 500-A  
Integrador - Processador - CG 300  
Rotaevaporador - Fisaton 802

### Reagentes

Diclorometano pa  
Etanol pa  
Substância de referência de cloridrato de dietilpropiona  
Substância de referência de cloridrato de femproporex  
Substância de referência de cloridrato de fenilpropanolamina  
Substância de referência de diazepam  
Solução de hidróxido de sódio 10% (p/v)  
Sulfato de sódio anidro pa  
Talco grau farmacêutico

### Material

Balão de fundo chato de 300 mL  
Balões volumétricos de 10 e 100 mL  
Funil de separação de 250 mL  
Funil de vidro  
Pipeta graduada de 5 mL  
Pipeta volumétrica de 5 mL  
Proveta de 50 mL

O método consistiu na extração dos princípios ativos com diclorometano em meio alcalino seguida de análise por cromatografia gasosa (método do padrão interno).

### Procedimento Geral

1<sup>ª</sup>. Etapa: Preparação das soluções padrão

a) Solução de padrão interno de cloridrato de fenilpropolanolamina

Preparou-se uma solução padrão de cloridrato de fenilpropolanolamina de concentração de, aproximadamente, 1mg/mL em etanol.

b) Solução padrão de diazepam

Preparou-se uma solução padrão de diazepam de concentração exata de, aproximadamente, 1 mg/mL em solução de padrão interno.

c) Solução padrão de dietilpropiona e femproporex

Para cada formulação, pesou-se exatamente uma quantidade de cloridrato de dietilpropiona e cloridrato de femproporex, guardada a proporção de cada fórmula, transferiu-se para um funil de separação com auxílio de 5 mL de água e adicionou-se 3 mL de solução de hidróxido de sódio 10%. Extraíu-se os fármacos, sucessivamente, com 04 (quatro) porções de 30 mL de diclorometano. Recolheu-se os extratos em balão de fundo chato, após filtração por meio de 1 g de sulfato de sódio anidro sobre algodão previamente lavados com o solvente. Evaporou-se o solvente em rotaevaporador, à temperatura de  $40 \pm 5$  °C, até volume de aproximadamente 2 mL, e com o auxílio de nitrogênio até *secura*. Dissolveu-se o resíduo em 5 mL de solução padrão de diazepam.

#### 2ª. Etapa: Preparação da solução amostra

Pesou-se exatamente uma quantidade de amostra correspondente a cada fórmula. Procedeu-se a extração como o descrito no item c da 1ª etapa do procedimento geral até a evaporação do solvente. Dissolveu-se o resíduo em 5 mL de solução de padrão interno.

#### 3ª. Etapa: Análise cromatográfica

Procedeu-se a análise cromatográfica<sup>4, 7</sup> utilizando-se coluna capilar de sílica fundida SE 30 de 0,25 mm x 25 m de acordo com a seguinte programação de temperatura: injetor, 285°C; detector, 295°C; forno, temperatura inicial de 190°C, mantida por 5 minutos e temperatura final de 280°C, mantida por 4 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com fluxo de 30 mL/min.

Injetou-se três vezes a solução padrão para calibração do integrador.

Injetou-se duas vezes cada solução da amostra.

#### 4ª. Etapa: Análise estatística

Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão. O coeficiente de variação do método foi calculado para cada substância analisada.

## RESULTADOS

Para cada fórmula estudada foram executadas 06 (seis) determinações de cada etapa do procedimento geral descrito.

Os resultados obtidos, apresentados na Tabela 2, foram submetidos a tratamento estatístico e as medidas de variabilidade destes resultados estão apresentados na Tabela 3.

A partir dos dados da Tabela 3, calculou-se a recuperação do método, apresentada na Tabela 4.

Os cromatogramas das substâncias de referência da formulação reconstituída estão representados na Figura 1.

TABELA 2

Quantidade (em miligramas) dos princípios ativos segundo a fórmula

Princípio ativo	Fórmula		
	A	B	C
Dietilpropiona, cloridrato	77,09	51,27	25,66
	76,61	51,16	25,45
	75,41	51,14	25,44
	74,50	50,45	24,74
	73,73	50,09	24,72
	72,63	48,89	24,39
Femproporex, cloridrato	30,58	20,21	10,27
	30,32	20,21	9,91
	29,64	20,13	9,91
	29,53	19,97	9,88
	29,02	19,62	9,76
	28,90	19,60	9,54

TABELA 3

Medidas de variabilidade da quantidade (em miligramas, miligramas ao quadrado e percentagem) dos princípios ativos dietilpropiona e femproporex segundo a fórmula

Medida de variabilidade	Fórmula		
	A	B	C
<b>Dietilpropiona cloridrato</b>			
X	75,00	50,50	25,07
S	2,92	0,84	0,27
s	1,71	0,92	0,52
CV	2,28	1,82	2,06
<b>Femproporex cloridrato</b>			
X	29,66	19,96	9,88
S	0,46	0,08	0,06
s	0,68	0,28	0,24
CV	2,28	1,42	2,41

Nota: X = Média aritmética (mg)  
 S = Variância (mg<sup>2</sup>)  
 s = Desvio padrão(mg)  
 CV = Coeficiente de variação (percentagem)

TABELA 4

Média (em percentagem) da recuperação do método para cada princípio ativo segundo a fórmula.

Princípio Ativo	Fórmulas		
	A	B	C
Dietilpropiona, cloridrato	100,00	101,00	102,67
Femproporex, cloridrato	98,87	99,80	98,80

### DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O método por cromatografia gasosa apresentado neste trabalho permite a separação e quantificação das

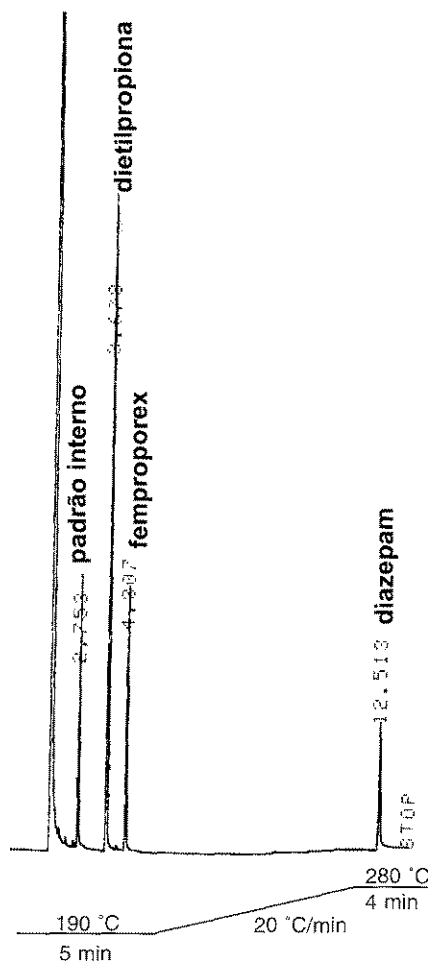


FIGURA 1 — Cromatograma de uma fórmula reconstituída com os padrões, dietilpropiona, femproporex e diazepam. Condições cromatográficas: coluna capilar SE 30 (25m x 0,25 mm), temperaturas do detector 295 °C e do injetor 285 °C, detector de ionização de chama.

anfetaminas, dietilpropiona e femproporex, de modo satisfatório, como mostram os cromatogramas da Figura 1. Nestes cromatogramas pode-se observar que houve a separação entre os picos da dietilpropiona e do femproporex com tempos de retenção de 3,7 e 4,3 minutos, respectivamente.

Anteriormente CHAVES et al,<sup>4</sup> descreveram um método por volumetria e espectrofotometria na região do UV para o doseamento destes princípios ativos em formulações para regime de emagrecimento; porém, devido às características químicas semelhantes, estas substâncias foram determinadas concomitantemente, identificando-se apenas a dietilpropiona. A aquisição de um cromatógrafo gasoso acoplado a um integrador - processador e a crescente necessidade de aprimoramento no con-

trole de qualidade de fórmulas manipuladas motivaram os autores para o desenvolvimento deste método.

O método possibilitou a separação e a quantificação de dietilpropiona e femproporex por cromatografia gasosa, simultaneamente, em formulações com proporções diferentes dos princípios ativos.

Observando-se a Tabela 3, os valores máximos de coeficientes de variação para dietilpropiona e femproporex foram 2,28% e 2,41%, respectivamente. Sendo o coeficiente de variação, em termos estatísticos, uma medida de dispersão, definida com o desvio padrão expresso em porcentagem da média<sup>3</sup>, conclui-se que no método apresentado para cada um dos princípios ativos, a variabilidade relativa dos resultados não excede o limite percentual de 2,41.

Na Tabela 4, observou-se que a recuperação dos princípios ativos nas 03 (três) fórmulas estudadas com-

preendeu um intervalo entre 100,00 - 102,67% e 98,80 - 99,80 para dietilpropiona e femproporex, respectivamente. Estatisticamente, são considerados satisfatórios os resultados compreendidos entre 90 e 110% em relação ao valor real dos princípios ativos em produtos acabados. Este intervalo de recuperação do método garante sua aplicabilidade nesta faixa de dosagem de princípios ativos.

A eficiência e confiabilidade do procedimento analítico apresentado podem ser confirmados por meio dos resultados de coeficiente de variação e porcentagem de recuperação do método.

O método estudado neste trabalho pode ser aplicado nos serviços de laboratório de controle de qualidade de medicamentos e na análise de formulações para regime de emagrecimento.

RIALA 6/857

TRUJILLO, L. M. ; CHAVES, M. A.; AKATUKA, A. S. & IHA, M. H. – Gas chromatography analysis of amphetamines and benzodiazepines in formulas for slim Study I: determination of diethylpropion and fenproporex. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 91-96, 1999.

**ABSTRACT:** This present study describes a gas chromatography method for simultaneous determination of diethylpropion and fenproporex that are present in formulas indicated for weight losing diets. This method was applied in three different formulas, consisting of drugs, in a range of quantities most commonly prescribed. The method consisted of amphetamines extraction with methylene chloride, followed by gas chromatography analysis, using phenylpropanolamine as an internal standard. The separation between the two substances was observed, with a retention time of 3,7 minutes for diethylpropion and 4,3 minutes for fenproporex. The maximum variation coefficient for the diethylpropion method was 2,28% and for the fenproporex it was 2,41%.

**DESCRIPTORS:** Gas chromatography; diethylpropion; fenproporex; formulas for slim.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASHTON, H. - Brain function and psychotropic drugs. Oxford University Press, 1992. p. 55-68, 75-77, 105.
2. BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P. & GOTLIEB, S.L.D. - Bioestatística. 1ª ed. rev., São Paulo, Editora Pedagógica e Universitária Ltda. 1981, p. 69-98.
3. BRASIL. Leis, Decretos etc - Portaria n° 344, de 12 de maio de 1998, da Secretaria de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde. *Diário Oficial da União*, Brasília, 19 de maio de 1998. Seção I, p. 37. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial.
4. CHAVES, M.A.; AKATUKA, A.S. & TRUJILLO, L.M. - Dietilpropiona, femproporex, diazepam e fenoltaleína: determinação em formulações para emagrecimento. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(1):36-43, 1994.
5. CLARKE'S - Isolation and identification of drugs. 2nd ed., London, The Pharmaceutical Press, 1986, p. 526-527, 538-539, 617.
6. GOODMAN AND GILMAN'S - The Pharmacological basis of therapeutics. 8th ed., New York, Pergamon Press, 1990, p. 187-218, 428-429, 920-921.
7. LEACH, H & RAMSEY, J.D. Gas chromatography. In: CLARKE'S. Isolation and identification of drugs. 2nd ed. London, The Pharmaceutical Press, 1986, p. 178-200.

8. MANSON, J.E. & FAICH, G.A. - Pharmacotherapy for obesity - Do the benefits outweigh the risks? *The New England Journal of Medicine*, **335**(9): 659-660, 1996.
9. MARTINDALE - The extra pharmacopeia. 31st ed., London, Royal Pharmaceutical Society, 1996. p. 700-707, 1549-1550, 1552.
10. MEDEIROS NETO, G. - Tratamento farmacológico da obesidade: a necessidade de uma revisão científica e filosófica. *Rev. Ass. Med. Brasil*, **39**(4):257-259, 1993.
11. SCHVARTSMAN, S. - Intoxicações agudas. 4ª ed., São Paulo, Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, 1991, p. 34, 75-76, 84-85.
12. WILSON, C.O.; GISVOLD, O. & DOERG, R.F. - Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 7th ed. Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1977, p. 374-377, 416-420, 952-954.

Recebido para publicação em 21/05/98



OCORRÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* E *ISOSPORA BELLI*  
NA REGIÃO DE CAMPINAS, SP.

Silvia Regina BARALDI\*  
Eneida Gonçalves Lemes MARQUES\*  
Rosa Maria Donini Souza DIAS\*\*

RIALA 6/858

BARALDI, S.R. MARQUES, E.G.L. & DIAS, R.M.D.S. - Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* na Região de Campinas, SP. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58(1): 97-103, 1999.

**RESUMO:** No período compreendido entre março de 1990 e dezembro de 1994 foi realizada pesquisa de coccídios em amostras de fezes de 172 pacientes, com e sem diarreia, na Seção de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz - Campinas, encaminhados pelos Serviços de Saúde do Município de Campinas e Região. Os pacientes foram divididos em dois grupos: indivíduos HIV positivos e suspeitos. Oocistos de *Cryptosporidium parvum* foram encontrados em 32 - 18,60% e de *Isospora belli* em 27 - 15,70% dos pacientes. Coinfecção pelos dois coccídios foi observada em 04 - 2,33% da população estudada. A ocorrência de ambos os coccídios entre os pacientes estudados foi de 31,98%.

**DESCRITORES:** Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS); HIV; *Cryptosporidium parvum*; *Isospora belli*; Parasitas Oportunistas; Campinas/SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

Dois enteroprotzoários, *C. parvum* e *I. belli* têm sido considerados importantes patógenos devido à severidade da infecção que desencadeiam em pacientes com AIDS<sup>3,25</sup>. Estes coccídios têm demonstrado a capacidade de atuar como importantes agentes oportunistas provocando quadros de diarreia aquosa<sup>4,17,30</sup>, levando à desidratação<sup>20</sup> e à perda de peso<sup>3,4,30</sup> nos pacientes com AIDS ou com outras imunodeficiências em todo o mundo. Entretanto, em pacientes imunocompetentes causam uma diarreia autolimitada<sup>3,13,25</sup>.

Criptosporidiose é transmitida de várias formas, pessoa a pessoa, animal-homem, homem-animal ou através da água contaminada por fezes animal ou humana, provocando casos esporádicos, ou mesmo surtos. A associação de *Cryptosporidium* como o agente causador da diarreia dos viajantes já está bem estabelecida através de descrição de vários casos na literatura<sup>16,23,26</sup>. Este parasita tem sido apontado como responsável por surtos diarrei-

cos e pela morbidade em crianças que tiveram um episódio de infecção até um ano de idade<sup>1,15</sup>. Atualmente a criptosporidiose é considerada importante causa de diarreia, nos Estados Unidos, onde 3-4% dos pacientes com AIDS são acometidos de enterite pelo *Cryptosporidium*, enquanto que no Haiti e na África 50% desses pacientes apresentam criptosporidiose<sup>23</sup>. Tipicamente, a duração da doença diarreica e o resultado definitivo da criptosporidiose intestinal dependem do estado imune do paciente. Em pacientes imunodeficientes, infecções pelo *C. parvum* nem sempre são limitadas ao trato gastrointestinal. Além do pulmão<sup>5,11,21</sup> têm sido encontrados casos de criptosporidiose provocando colecistite, hepatite e pancreatite<sup>3</sup>. Novos medicamentos estão sendo exaustivamente testados<sup>12,27,29</sup>, assim como terapia antiretroviral que parece se mostrar eficiente no desaparecimento dos sintomas<sup>2,7</sup>. Ramratinan et al,<sup>22</sup> consideram que não há tratamento uniformemente efetivo na criptosporidiose relacionada à AIDS pois o atual se baseia em ensaios antiretrovirais, medicações anti-*Cryptosporidium*, reposição

\* Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Campinas.

\*\* Instituto Adolfo Lutz Central - São Paulo.

de líquidos e apoio nutricional além dos agentes antimotilidade intestinal. Segundo Tzipori<sup>28</sup>, embora o desenvolvimento de novas drogas tenha sido intenso e sistemático não resultou na descoberta de uma terapia eficaz contra o *C. parvum* e sugere que esta falha seja devido à localização do parasita entre a membrana celular e o citoplasma da célula, e que este fator deva ser considerado ao se buscar novas terapias. O mesmo autor salienta que esta localização pode significar uma barreira para drogas antiprotozoários e antimicrobianas.

*Isospora belli* é encontrada mais comumente em climas tropicais e subtropicais. É endêmica em certas partes da América do Sul, África, sudeste da Ásia e tem sido apontada como agente de surtos de diarreia em instituições nos Estados Unidos<sup>25</sup>. A transmissão ocorre diretamente de pessoa a pessoa, por via fecal-oral e através de água e alimentos contaminados pelos oocistos<sup>14</sup>. Embora seja pouco comum nos Estados Unidos, onde acomete menos que 0,2% dos pacientes com AIDS (Centers for Disease Control), no Haiti tem sido encontrada em 15% desses pacientes<sup>25</sup>. *I. belli* é um parasita obrigatório das células do intestino delgado onde ocorre todo o seu ciclo reprodutivo<sup>13,14</sup>. É um enteroprotzoário monoxênico<sup>13,14,17</sup> e possui apenas um hospedeiro, o homem. Em 1915, Woodcock descreveu o primeiro caso de isosporíase<sup>13,17</sup> e em 1925 foi descrito o primeiro caso no Brasil, em São Paulo, por Pinto e Pacheco<sup>13</sup>. Até 1963 pouco se sabia sobre a patogenia da *Isospora belli*, em decorrência da quase ausência de estudos a esse respeito. Após os trabalhos de Niedman et al., Brandborg et al., Trier et al., Modigliani et al., com biópsia jejunal, houve acentuado avanço nesse setor - seu ciclo e sua patogenia foram melhor conhecidos<sup>13</sup>. Em contraste à criptosporidiose, a isosporíase, no momento, pode ser tratada<sup>19,25</sup>, mas nos pacientes com AIDS, como profilaxia, é necessária a manutenção da terapia, para evitar a recorrência da infecção<sup>9</sup>. O objetivo do presente trabalho é de estudar a ocorrência dos coccídios *C. parvum* e *I. belli* no município de Campinas e Região, em dois grupos: pacientes HIV positivos e pacientes suspeitos.

## MATERIAL E MÉTODOS

No período compreendido entre março de 1990 e dezembro de 1994 foram analisadas, na Seção de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz do Laboratório I de Campinas, 285 amostras de fezes de 172 pacientes com e sem diarreia, encaminhadas pela Rede Básica (Unidades Básicas de Saúde e Ambulatórios Especializados em DST/AIDS) e Rede Hospitalar de Saúde do Município de Campinas e Região, para pesquisa dos coccídios *C. parvum* e *I. belli*. As amostras foram preser-

vadas em solução de formalina a 10% tamponada, pH 7,0-7,2 e submetidas à técnica de concentração pelo método de formol éter modificado<sup>4</sup>. Do sedimento obtido foram feitos esfregaços em lâminas, que foram secos à temperatura ambiente, fixados com álcool metílico p.a. e corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada a frio. Cobriu-se o esfregaço com fucsina carbólica de Ziehl-Neelsen por 30 minutos; lavou-se com água corrente, descorou-se com álcool ácido (ácido clorídrico a 3% em etanol 95%), lavou-se com água corrente, cobriu-se com verde de malaquita a 2% por 1 minuto e a seguir lavou-se em água corrente. As lâminas foram examinadas utilizando-se aumentos de 400x e 1.000x.

Os pacientes foram divididos em dois grupos e o critério de seleção foram os dados enviados na requisição médica: 89 pacientes acometidos da infecção pelo HIV (HIV positivos) e 83 suspeitos de serem portadores do mesmo vírus, visto que o Serviço destina-se à pesquisa de parasitas oportunistas em AIDS.

A população foi estudada em relação à distribuição por sexo, origem do material recebido, número de amostras e consistência. Numa segunda etapa, os pacientes foram separados por faixa etária.

Submeteram-se os dados obtidos ao método estatístico, para análise pelo teste de Qui Quadrado ( $\chi^2$ ) com o fim de comprovar a significância dos resultados encontrados.

## RESULTADOS

Dos 172 pacientes encaminhados pela Rede Básica (Unidades Básicas de Saúde e Ambulatórios Especializados em DST/AIDS) e Rede Hospitalar do Município de Campinas, SP, e Região, 55 (31,98%) apresentavam-se positivos para as coccidioses (Tabela 1), sendo que 32 (18,60%) apresentaram-se parasitados por *C. parvum*, 27 (15,70%) por *I. belli* e 04 (2,33%) se encontravam albergando os dois parasitas.

Destes pacientes, 89 (51,74%) eram de indivíduos HIV positivos e, 83 (48,26%), de indivíduos suspeitos. Estudando-se os dois parasitas dentro de cada grupo, verificou-se diferença não significativa estatisticamente ( $p > 0,05$ ) - (Tabela 2).

Do total dos pacientes, 137 (79,65%) pertenciam ao sexo masculino, e 35 (20,35%), ao sexo feminino (Tabela 1), com idade variando de 07 meses a 65 anos e 18 sem informação quanto à idade (Tabela 4).

Das 285 amostras, foram analisadas no mínimo 01 e no máximo 13 de cada paciente: 112 pacientes (65,12%), uma única amostra; 36 (20,93%), duas amostras; 15 (8,72%), três amostras; 03 (1,74%), quatro amostras; 01 (0,58%), cinco amostras; 03 (1,74%), seis amostras; 01 (0,58%), oito amostras; e 01 (0,58%), treze

amostras. Em relação à consistência, verificou-se que nas fezes formadas (96), encontrou-se uma positividade de 28,13% - 27 amostras, nas diarreicas (96) 30,21% - 29 amostras, nas enviadas em conservante (80) 26,25% - 21 amostras e nas sem informação quanto à consistência (13) 46,15% - 06 amostras.

Dos 172 pacientes investigados, 81 (47,09 %) foram encaminhados pelo Serviço de DST/AIDS do Município de Campinas, SP. Neste Serviço encontramos a maior porcentagem de indivíduos com resultados positivos: 29 pacientes (Tabela 3).

A maior positividade em relação à faixa etária, ocorreu nos pacientes com idade entre 25 e 30 anos, onde observou-se índice mais elevado de infecção por *C. parvum* - 14 pacientes, seguido por *I. belli* - 10 pacientes, sendo que 03 apresentaram infecção pelos dois parasitas citados (Tabela 4). Observou-se para *C. parvum*, diferença significativa na faixa etária entre 25-30 anos ( $p < 0,05$ ), já para *I. belli* esta análise mostrou diferença não significativa ( $p > 0,05$ ).

TABELA 1

Ocorrência de *C. parvum* e *I. belli* em 172 Pacientes do Município de Campinas, SP e Região. Separação por sexo.

Enteroprotzoários	Sexo				Total	
	Masculino		Feminino		N.º	%
	N.º	%	N.º	%		
<i>C. parvum</i>	22	16,66	10	28,57	32	18,60
<i>I. belli</i>	18	13,14	09	25,71	27	15,70
Total de pacientes positivos	39*	28,47	16**	45,71	55***	31,98
Total geral de pacientes	137	100	35	100	172	100

\* 01 paciente apresentou coinfeção por ambos os coccídios

\*\* 03 pacientes apresentaram coinfeção por ambos coccídios

\*\*\* 04 pacientes apresentaram coinfeção por ambos os coccídios

TABELA 2

Ocorrência de *C. parvum* e *I. belli* em pacientes HIV positivos e em indivíduos suspeitos.

Enteroprotzoários	Pacientes HIV positivos		Pacientes Suspeitos		Total	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%
<i>C. parvum</i>	16	17,98	16	19,28	32	18,60
<i>I. belli</i>	16	17,98	11	13,25	27	15,70
Total de pacientes positivos	30*	33,71	25**	30,12	55***	31,98
Total de pacientes	89	100	83	100	172	100

\* 02 pacientes com coinfeção por ambos os coccídios

\*\* 02 pacientes com coinfeção por ambos os coccídios

\*\*\* 04 pacientes com coinfeção por ambos os coccídios

TABELA 3

Ocorrência, quanto ao local de envio, das amostras recebidas pelo Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Campinas, SP, no período de março de 1990 a dezembro de 1994.

	Pacientes com resultados positivos		Pacientes com resultados negativos		Total de pacientes	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%
MUNICÍPIO	37	67,27	65	55,56	102	59,30
Rede básica de saúde - DST/AIDS	29	52,72	52	44,44	81	47,09
Rede básica de saúde - outros	01	1,82	03	2,56	04	2,33
Rede hospitalar	07	12,73	10	8,55	17	9,88
REGIÃO	18	32,73	52	44,44	70	40,70
Rede básica de saúde - DST/AIDS	05	9,09	24	20,51	29	16,86
Rede básica de saúde - outros	12	21,82	25	21,37	37	21,51
Rede hospitalar	01	1,82	03	2,56	04	2,33
Total	55	100	117	100	172	100

TABELA 4

Ocorrência de *C. parvum* e *I. belli* em 172 pacientes do Município de Campinas, SP, e Região, segundo a faixa etária.

Faixa Etária	<i>C. parvum</i>	<i>I. belli</i>	Negativos	Total
0 † 5 anos	02	01	02	05
5 † 10 anos		01		01
10 † 15 anos		01		01
15 † 20 anos	01		01	02
20 † 25 anos	03	01	21	25
25 † 30 anos	14	10	27	48 *
30 † 35 anos	03	02	27	32
35 † 40 anos	05	04	11	19 **
40 † 45 anos	02	04	05	11
45 † 50 anos		01	05	06
50 † 55 anos			03	03
55 † 60 anos				
60 † 65 anos				
65 † 70 anos			01	01
S.Inform.	02	02	14	18
Total	32	27	117	172

\* 03 pacientes apresentaram coinfeção por ambos os coccídios.

\*\* 01 paciente apresentou coinfeção por ambos os coccídios.

## DISCUSSÃO

O surgimento da síndrome da imunodeficiência adquirida modificou os padrões de ocorrência de muitas infecções parasitárias. Entre as parasitoses intestinais, a criptosporidiose e a isosporíase tornaram-se comuns nestes pacientes, que são particularmente suscetíveis à severa infecção causada por coccídios<sup>30</sup>. No Brasil, tem sido observado em pacientes com AIDS relatos de *C. parvum* de 12,10%<sup>6</sup>, 18,2%<sup>18</sup> e 19,1%<sup>24</sup> e para *I. belli* de 5,73%<sup>6</sup>, 9,9%<sup>24</sup> e 10,1%<sup>18</sup>.

Os resultados do presente trabalho mostram ocorrências próximas para *C. parvum* e mais elevadas em relação à *I. belli* quando comparados ao estudo de Garlipp et al<sup>8</sup> (1995) em 111 pacientes com diarreia (83% eram pacientes HIV positivos) atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), que apresentou uma taxa de 18,0% para *C. parvum* e 5,4% para *I. belli*. Em relação ao *C. parvum* os dados do presente trabalho mostram-se muito semelhantes, embora o presente estudo não se limite a fezes diarreicas. Em relação à *I. belli* nossos números foram superiores, este fato leva-nos à possibilidade de um aumento na prevalência da isosporíase no Município de Campinas, SP.

Guarino et al<sup>10</sup> relatam que a presença do *Cryptosporidium* nas fezes pode ser considerada um sinal de progressão da infecção pelo HIV.

A elevada prevalência de *I. belli* encontrada no presente trabalho pode ser devido ao fato de terem sido analisadas várias amostras de cada paciente (1 a 13), evitando-se assim que os oocistos não fossem encontrados devido ao seu pequeno número eliminado, ou à intermitência na excreção dos coccídios nas fezes, como referiram Wuhib et al<sup>31</sup> em seu trabalho sobre protozoários em pacientes HIV positivos.

As coccidioses acometeram os dois grupos investigados, ou seja, pacientes HIV positivos e pacientes suspeitos (tabela 2). Os dados obtidos após análise estatística dos resultados revelaram que a diferença não foi significativa ( $p > 0,05$ ), podendo ser considerados como um único grupo de estudo. Este fato é compreensível visto que a maior porcentagem de indivíduos 47,09% (81) foi encaminhada para pesquisa de parasitas oportunistas pelo Serviço de DST/AIDS do Município de Campinas, SP, e provavelmente tratavam-se de pacientes HIV positivos (tabela 3). Os laboratórios do Instituto Adolfo Lutz fazem parte da Rede de Laboratórios de Referência Nacional e Macroregional para Infecções Oportunistas e têm um papel importante nos programas de controle DST/AIDS.

Ao estudar-se as populações em relação à origem das amostras verificou-se que 59,30% (102) eram origi-

nárias do Município de Campinas, SP, e 40,70% (70) da Região, sendo que o maior número de pacientes com resultados positivos 67,27% (37) eram do Município de Campinas, SP, e 32,73% (18) eram da Região o que poderia ser atribuído ao fato de ser o Serviço Especializado em DST/AIDS do Município de Campinas, SP, o que maior número de pacientes encaminhou para investigação.

Os coccídios *C. parvum* e *I. belli* são importantes agentes oportunistas de diarreia crônica severa entre pacientes com AIDS<sup>4</sup>. Os resultados encontrados quando se pesquisaram estes dois parasitas em fezes formadas e fezes diarreicas, mostraram-se próximos, e dados da literatura geralmente referem uma maior prevalência em fezes diarreicas do que em fezes formadas.

No presente trabalho, a população estudada apresentou uma ocorrência maior de coccídios na faixa etária de 25 -30 anos. Este fato, provavelmente está ligado à própria epidemia da AIDS, pois como trata-se de um evento relativamente recente, houve uma maior incidência destes parasitas oportunistas sobre esta faixa etária no período estudado (1990-1994). Atualmente devido à exaustiva procura de novas terapias para prolongar a sobrevivência dos pacientes, a ocorrência maior destes parasitas oportunistas poderá se deslocar para outras faixas etárias.

## CONCLUSÃO

Verificou-se em pacientes HIV positivos e suspeitos do Município de Campinas, SP, e Região, um parasitismo maior por *C. parvum*, do que por *I. belli* e raros casos de infecção mista.

Observou-se um aumento acentuado de *I. belli* quando comparado a estudos da literatura. A ocorrência de coccídios encontrados nas fezes diarreicas foi semelhante à encontrada nas fezes formadas. Os autores chamam a atenção para que profissionais da área de saúde estejam atentos para a utilização de técnicas diagnósticas apropriadas para o encontro desses coccídios, pois estes parasitas, importantes agentes de diarreia, além de acometerem a população com AIDS, têm sido descritos em outras imunodepressões e em surtos de diarreia em crianças imunocompetentes.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos pesquisadores Ana Célia Steffen Mangini, Sylvania A.G. Velloso e José Leopoldo F. Antunes do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pela assistência em técnicas parasitológicas, análises estatísticas e comentários deste documento.

BARALDI, S.R.; MARQUES, E.G.L. & DIAS, R.M.D.S. - Occurrence of *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* in the area of Campinas, SP. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 97-103, 1999.

ABSTRACT: From March 1990 to December 1994 feces samples from 172 with and without diarrhoea patients, who demanded primary medical care in Health Services, were analysed in the Medical Biology Laboratory at Institute Adolfo Lutz - Campinas, SP. Samples sent by Health Services from Campinas County and Region were analysed aiming to research coccidian parasites among HIV positive and suspects patients. The occurrence of both coccidia among the studied patients was 31,98%. Oocysts of *Cryptosporidium parvum* were demonstrated in 32 - 18,60% and *Isospora belli* in 27 - 15,70%. Coinfection for both coccidia was observed in 04 patients - 2,33%.

DESCRIPTORS: Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS); HIV; *Cryptosporidium parvum*; *Isospora belli*; Opportunist Parasites; Campinas, SP, Brazil.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGNEW, D.G.; LIMA, A.A.M.; NEWMAN, R.D.; WUHIB, T.; MOORE, R.D.; GUERRANT, R.L. & SEARS, C.L. Cryptosporidiosis in Northeastern Brazilian Children: Association With Increased Diarrhea Morbidity. *J. Infect. Dis* 177(3): 754-760, 1998.
2. CARR, A.; MARIOTT, D.; FIELD, A.; VASAK, E. & COOPRER, D A. Treatment of HIV-1- associated Microsporidiosis and Cryptosporidiosis with combination antiretroviral therapy. *Lancet* 351 (9098) : 256-261, 1998.
3. CURRENT, W.L. & GARCIA, L.S. Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev* 4 (3): 325 - 358, 1991.
4. DE HOVITZ, J.A.; PAPE, J.W.; BONCY M.; JOHNSON, Jr., W.D. Clinical Manifestation and Therapy of *Isospora belli* infection in patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 315 (2) : 87 -90, 1986.
5. DEL BIANCO, R.; GEGER, M.; PAPPALARDO, M.C.S.M.; DIAS, R.M.D.S.; CORREA, M.O.A. & CHIEFFI, P.P.; Criptosporidiose pulmonar em pacientes com AIDS / SIDA: estudo de dois casos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 20 (supl): 23, 1987.
6. DIAS, R.M.D.S.; PINTO, W.P.; CHIEFFI, P.P.; MANGINI, A.C.S.; TORRES, D.M.A.G.V.; DEL BIANCO, R & FERRARI, L. Enteroparasitoses em pacientes acometidos pela Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS/SIDA). *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 48 (1/2) : 63 - 67, 1988.
7. FOU德拉INE, N. A.; WEVERLING, G. J.; VAN GOOL, T.; ROSS, M.T.; DE WOLF, F.; KOOPMANS, P.P.; VAN DEN BROEK, P.J.; MEESNHORST, P.L.; VAN LEEUWEN, R.; LANGE, J.M. & REISS, P. Improvement of chronic diarrhoea in patients with advanced HIV-1 infection during potent antiretroviral therapy. *AIDS* 12(1): 35 -41, 1998.
8. GARLIPP, C.R.; BOTTINI, P.V. & TEIXEIRA, A.T.L.S. The Relevance of laboratory diagnosis of human cryptosporidiosis and other coccidia. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 37 (5) : 467 - 469, 1995.
9. GOODGAME, R.W. Understanding Intestinal Spore - Forming Protozoa: Cryptosporidia, Microsporidia, Isospora, and Cyclospora. *Ann. Intern. Med.* 124: 429-441, 1996.
10. GUARINO, A.; CASTALDO, A.; RUSSO, S.; SPAGNUOLO, M.I.; CANANI, R.B.; TARALLO, L.; DIBENEDETTO, L. & RUBINO, A. Enteric Cryptosporidiosis in Pediatric HIV Infection. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 25(2):182-187, 1997.
11. HOJLYNG, N. & JENSEN, B. N. Respiratory Cryptosporidiosis in HIV - positive patients. *Lancet* 1: 590-591, 1988.
12. HOLMBERG, S.D.; MOORMAN, A.C.; VON BARGEN, J.C.; PALELLA, F.J.; LOVELESS, M.O.; WARD, D.J. & NAVIN, T.R. Possible effectiveness of Clarithromycin and Rifabutin for Cryptosporidiosis chemoprophylaxis in HIV disease. HIV Outpatient Study (HOPS) Investigators. *JAMA* 279 (5): 384-386, 1998.

13. UGGINS, D.W.; MEDEIROS, L.B.; MELO, S.A. & FARIAS JUNIOR, H.A. Isosporíase: atualização. *Rev. Pat.Trop.*, 22 (1): 71 -90, 1993.
14. LAMOUNIER, J.A.; WESTIN, O.F.; SALLES, D.S.V. Infecção pelo prozoário *Isospora belli* : apresentação de caso e revisão bibliográfica. *Rev. Med.Minas Gerais* 2 (2): 113 -115, 1992.
15. MANGINI, A.C.S.; DIAS, R.M.D.S.; GRISI, S.J.F.E.; SCOBAR, A.M.U.; TORRES, D.M.A.G. V.; ZUBA, I.P.R. ; QUADROS, C.M.S. & CHIEFFI, P.P. Parasitismo por *Cryptosporidium sp* em crianças com diarreia aguda. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 34: 341-345, 1992.
16. Ma, P.; Kaufman, D.L.; Helmick, C.G.; D'Souza, A.J.; Navin, T.R. Cryptosporidiosis in tourists returning from the Caribbean. *N. Engl. J. Med.* 312: 647-648, 1985.
17. MICHIELS, J.F.; HOFMAN, P.; BERNARD,E.; SAINT PAUL, M.C.; BOISSY, C.; MONDAIN, V.; LE FICHOUX, Y. & LOUBIERE, R. Intestinal and extra intestinal *Isospora belli* infection in an AIDS patient: A second case report. *Path. Res. Pract.* 190: 1089 - 1093, 1994.
18. MOURA, H.; FERNANDES, O.; VIOLA, J. P.B.; SILVA, S.P.; PASSOS, R.H.; LIMA, D. B. Enteric Parasites and HIV infection: occurrence in AIDS patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84 (4): 527 - 533, 1989
19. NG, E.; MARKELL, E.K.; FLEMING, R. L. & FREID, M. Demonstration of *Isospora belli* by acid-fast stain in a patient with Acquired Immune Deficiency Syndrome. *J. Clin. Microbiol* 20 (3): 384 - 386, 1984.
20. PAPE, J.W.; VERDIER, R.I.; & JOHNSON,JR, W.D. Treatment and prophylaxis of *Isospora belli* infection in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 320 (16) : 1044 - 1047, 1989.
21. PELLICELLI,A.M.; PALMIERI,F.; SPINAZZO-LA,F.; D'AMBROSIO,C.; CAUSO,T.; DE MORI, P.; BORDI, E. & D'AMATO,C. Pulmonary Cryptosporidiosis in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Minerva Med.*89 (5): 173 -175, 1998.
22. RAMRATNAM,B. & FLANIGAN ,T.P. Cryptosporidiosis in persons with HIV infection. *Postgrad Med. J.* 73 (865): 713 -716 , 1997.
23. RODRIGUES , J.L. N.; LESER, P. ; S SILVA, T. M. J. SANTOS, M. I. D.; DALBONE, M. A.; ACCENTURI, C.A. & CASTELO FILHO, A. Prevalência de criptosporidiose na síndrome diarreica do paciente HIV positivo. *Rev. Ass. Med. Brasil.* 37 (2) : 79 - 84, 1991.
24. SAUDA, F.C.; ZAMARIOLI, L.A.; EBNER FILHO, W. & MELLO, L.B. Prevalence of *Cryptosporidium sp* and *Isospora belli* among AIDS patients attending Santos Reference Center for AIDS, São Paulo, Brazil. *J. Parasit.* 79 (3): 454- 456, 1993.
25. SOAVE, R. & JOHNSON, JR., W.D. *Cryptosporidium* and *Isospora belli* infections: AIDS commentary. *J.Infect. Dis.* 157 (2): 225 - 229, 1988.
26. SOAVE, R. & MA, P. Cryptosporidiosis. Traveler's diarrhea in two families. *Arch. Intern. Med.* - 145: 70-72, 1985.
27. SPRINZ, E.; MALLMAN,R.; BARCELLOS, S.; SILBERT,S; SCHESTATSKY, G. & BEM DAVID, D.AIDS- related Cryptosporidial diarrhoea: an open study with Roxithromycin. *J.Antimicrob. Chemother.*41suppl B.:85-91,1998.
28. TZIPORI,S. Cryptosporidiosis: Laboratory investigations and chemotherapy . *Adv.Parasitol.* 40: 187 -221,1998.
29. UIP,D.E.; LIMA, A.L.L.; AMATO ,V.S.; BOULOS, M.; NETO,V.A.& BEM DAVID,D. Roxithromycin treatment for diarrhoea caused by *Cryptosporidium spp.* in patients with AIDS. *J.Antimicrob. Chemother.* 41 suppl. B: 93-97,1998.
30. WHITESIDE, M.E.; BARKIN, J.S.; MAY, R.G.; WEISS, S.D.; FISCHL, M.A. & MAC LEOD, C.L. Enteric coccidiosis among patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Am.J.Trop. Med. Hyg.* 33 (6): 1065 - 1072, 1984.
31. WUHIB,T.; SILVA,T.M.J.; NEWMAN,R.D.; GARCIA,L.S.; PEREIRA,M.L.D.; CHAVES,C.S.; WAHLQUIST,S.P.; BRYAN,R.T.; GUERANT,R.L.; SOUSA,A.Q.; QUEIROZ,T.R.B.S.& SEARS,C.L. Cryptosporidial and Microsporidial Infections in Human Immunodeficiency Virus- Infected Patients in Northeastern Brazil. *J. Infect. Dis.*170:494-497,1994.

Recebido para publicação em 07/05/98

Impressão em off set



Rua Clark, 136 - Moóca  
03167-070 - São Paulo - SP  
Fones: (011) 6692-7344  
6602-2225/6692-8749

com filmes fornecidos pelo editor