



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
SÃO PAULO, SP - BRASIL

REVISTA
do
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

ISSN0073-9855

RIALA6

VOLUME 44

NÚMERO 2

DEZEMBRO, 1984



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
SÃO PAULO, SP - BRASIL

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

REDATOR RESPONSÁVEL

WALDOMIRO PREGNOLATTO
Diretor do Instituto Adolfo Lutz

COMISSÃO DE REDAÇÃO

MARCELO OSWALDO ALVARES CORRÊA, *Presidente*
ELZA SCHWARZ GASTALDO BADOLATO
LUÍS FLORÊNCIO DE SALLES GOMES
MYRNA SABINO
NEUS PASCUET PREGNOLATTO
ODAIR ZENEBO
PEDRO PAULO CHIEFFI
ROBERTO A. PINTO PAES
SARA TETNER BURSTEIN, *Secretário*

REDATOR-SECRETÁRIO

DÉBORA DOMINGUES ESTRELLA REBOCHO

Endereço/address

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355 — Caixa Postal 7027
01000 — São Paulo, SP — Brasil
Endereço telegráfico: IALUTZ

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 —

1941-1983, 1-43

1984, 44(1, 2)

ISSN 0073 — 9855
RIALA6

CDD₁₈ 614.07205



(*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. *Normas para catalogação de publicações seriadas nas bibliotecas especializadas.* São Paulo, Ed. Polígono, 1972.

Os artigos publicados na REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ são indexados por Analytical Abstracts, Bibliografia Brasileira de Medicina, Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Excerpta Medica, Food Science and Technology Abstracts, Index Medicus Latino-americano, Tropical Diseases Bulletin and Virology Abstracts.

Rev. Inst. Adolfo Lutz, 44(2): 87-190, dez. 1984.

SUMÁRIO/CONTENTS

- 578 Separação e determinação das aflatoxinas M_1 e M_2 em amostras de leite de vaca por cromatografia líquida de alta resolução
Separation and determination of aflatoxins M_1 and M_2 in samples of cow milk by high-performance liquid chromatography
Myrna SABINO; Adhemar PURCHIO & Maria Ângela P. ZORZETTO 87-99
- 579 Separação e quantificação das aflotoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 por cromatografia líquida de alta resolução
A method for separation and determination of aflatoxins B_1 , B_2 , G_1 , and G_2 by high-performance liquid chromatography
Myrna SABINO & Maria Ângela ZORZETTO 101-108
- 580 Níveis de nitratos em beterraba
Nitrate levels in sugar-beet
Walkyria H. LARA; Mickiko Y. TAKAHASHI & Helena Y. YABIKU 109-113
- 581 Considerações sobre 5.360 hemoculturas realizadas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo
Considerations on 5.360 blood cultures performed in Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil
Maria Cristina de Cunto BRANDILEONE; Carmo Elias Andrade MELLES; Tânia Mara Ibelli VAZ; Suzel Nogueira NEME; Vera Simonsen Dias VIEIRA & Gil Vital Álvares PESSÓA 115-123
- 582 Listeriose humana. Prevalência dos sorotipos de *Listeria monocytogenes* isolados no Brasil
Human listeriosis. Prevalence of the serotypes of Listeria monocytogenes in Brazil
Ernesto HOFFER; Gil Vital Álvares PESSÓA & Carmo Elias Andrade MELLES 125-131
- 583 Determinação polarográfica do ácido L-ascórbico em produtos de panificação contendo polisorbato 60 ou 80
Polarographic determination of ascorbic acid in bread products containing polysorbate 60 or 80
Odair ZENEON; Myrna SABINO & Maria J. CORRÊA 133-140
- 584 Estudo comparativo dos métodos do eletrodo seletivo e da redução pela coluna de cádmio para a determinação de nitrato em água mineral
Comparative study of the specific potentiometric electrode and the reduction in cadmium-column method for determination of nitrates in mineral water
Jorge J. do Vale OLIVEIRA; Odair ZENEON & Cecília C. M. dos SANTOS 141-147

- 585 Determinação de resíduos de fosfina em alimentos
Determination of phosphin residues in foods
Heloisa H. C. BARRETTO; Odete N. K. INOMATA & Walkyria H. LARA 149-153
- 586 Pesquisa de antibacterianos no líquido cefalorraquidiano
Search for antibacterial substances in the spinal fluid of patients
Carmo Elias Andrade MELLES; Ilka Maria Landgraf LEE & Augusto E. TAUNAY 155-159
- 587 Isolamento de bactérias enteropatogênicas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo
Isolation of enteropathogenic bacteria from feces collected between 1977 and 1983 in São Paulo, Brazil
Kinue IRINO; Elena KANO; Angela Maria Girardi DIAS; Chifumi Tacheuchi CALZADA; Suzel Nogueira NEME; Sueli Aparecida FERNANDES; Leda Kano NAKAHARA & Gil Vital Álvares PESSÔA 161-178
- 588 Anticorpos neutralizantes para adenovírus tipos 1 a 7 em habitantes da cidade de São Paulo, Brasil, em 1982
Neutralizing antibodies against types 1 to 7 adenovirus in inhabitants of the city of São Paulo, Brazil, 1982
Maria Akiko ISHIDA; Shunji SAKAKIBARA & Yoko YOKOTA 179-183

SEPERAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS AFLATOXINAS M₁ E M₂ EM AMOSTRAS DE LEITE DE VACA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO *

Myrna SABINO **
Adhemar PURCHIO ***
Maria Ângela P. ZORZETTO **

RIALA6/578

SABINO, M.; PURCHIO, A. & ZORZETTO, M.A.P. — Separação e determinação das aflatoxinas M₁ e M₂ em amostras de leite de vaca por cromatografia líquida de alta resolução. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):87-99, 1984.

RESUMO: Aflatoxinas B₁, M₁ e M₂ foram completamente separadas por cromatografia líquida de alta resolução em coluna de fase reversa (C18), tendo como fase móvel acetonitrila — água (35 + 65%) a um fluxo de 2,0 ml/min. Os compostos foram detectados por absorção no ultravioleta a 350 nm. Os picos e tempo de retenção tiveram boa reprodutibilidade. A recuperação de aflatoxina M₁ foi de 87,5% e a de M₂ foi de 102%. Os limites de detecção para aflatoxina M₁ e M₂ foram 0,2 ppb e 0,1 ppb respectivamente.

DESCRITORES: aflatoxinas M₁ e M₂ em leite de vaca, determinação; leite de vaca, determinação de aflatoxinas M₁ e M₂; cromatografia líquida de alta resolução.

INTRODUÇÃO

A aflatoxina M₁ é um metabolito tóxico encontrado no leite de vacas que consomem rações contaminadas por aflatoxina B₁. Métodos analíticos para determinação desta substância começaram a surgir no decorrer dos anos, de maneira gradual, mas apresentando técnicas de baixa reprodutibilidade.

Em 1973 PONS *et alii*¹³ reportaram um método para determinação quantitativa de aflatoxina M₁ em leite e seus derivados. STUBBLEFIELD & SHANNON²⁰ adaptaram este método para todos os produtos lácteos e o empregaram, em estudo colaborativo internacional para a "Association of Official Analytical Chemists. Este método foi adotado como oficial por esta entidade¹ e é extensivamente utilizado por analistas dos Estados Unidos.

No outono de 1977, no sudeste dos Estados Unidos, ocorreu uma alta incidência de aflatoxina B₁ em milho e, conseqüentemente, foi detectada a presença de altos níveis de aflatoxina M₁ no leite de vaca da região¹⁹. Este fato fez com que a "Food and Drug Administration" estabelecesse o limite de tolerância de 0,5 ppb de aflatoxina M₁ em leite de vaca.

Com o objetivo de obter métodos mais rápidos e sensíveis, diversos trabalhos foram realizados^{7, 18, 25}. O número de métodos para determinação de aflatoxina M₁ na literatura é abundante e em todos é utilizada a cromatografia em camada delgada^{1, 11, 15, 16, 18, 25}. A A quantificação de aflatoxinas é estimada após separação das mesmas por cromatografia em camada delgada e a intensidade de fluorescência da mancha da aflatoxina M₁ extraída do leite de vaca é comparada com a de uma solução-padrão^{1, 8}.

* Realizado na Seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, SP.

Outros métodos, como densitometria^{1, 8} ou espectrofotometria de fluorescência⁴ foram utilizados por alguns autores; esta última metodologia é, freqüentemente, prejudicada por materiais fluorescentes interferentes, que alteram a avaliação da aflatoxina M₁.

Cromatografia em camada delgada bidimensional tem sido empregada para identificação de baixos níveis de aflatoxina M₁, após tratamento com ácido trifluoracético^{23, 26}.

Pesquisas indicam que a concentração de aflatoxinas nos tecidos animais, e nos produtos derivados de animais que consumiram rações contaminadas é geralmente baixa (na ordem de ng/g). Entretanto, para o ser humano, nenhum nível ainda foi estabelecido⁵.

Existem métodos para determinação de aflatoxinas em tecidos e produtos animais baseados na extração destas com acetona aquosa^{13, 24}, ou metanol³, purificação do extrato por cromatografia em coluna (sílica gel ou alumina)⁸ e quantificação por cromatografia em camada delgada, geralmente bidimensional. Estes métodos, no entanto, são freqüentemente limitados pela baixa sensibilidade que apresentam.

Com o advento da cromatografia líquida de alta resolução (CLAR), esta técnica está ganhando espaço como análise instrumental. Esta ocorrência veio solucionar diversos problemas analíticos, resultando em maior velocidade de análise, maior resolução, maior sensibilidade.

Cromatografia líquida de alta resolução, em fase normal, tem sido desenvolvida¹⁷ e adaptada para determinação de aflatoxinas em vários produtos agrícolas^{12, 14}. A sensibilidade de detecção tem aumentado com o uso de fluorescência^{10, 12}, em colunas de fase reversa^{2, 27}.

Alguns autores destacam as vantagens da técnica de CLAR para aflatoxinas M₁ e M₂^{6, 21, 22, 27, 28}.

É conveniente ressaltar que, nos trabalhos encontrados na literatura para detecção de aflatoxina M₂, por CLAR, é utilizado detector de fluorescência^{2, 6, 22}. Apenas STUBBLEFIELD *et alii*²¹ estabeleceram uma técnica utilizando CLAR em fase reversa para determinar 6 aflatoxinas, onde 5 delas M₂, M₁, G₂, G₁ e B₁ foram completamente separadas, e uma aflatoxina, a B₂, foi satisfatoriamente resolvida em coluna C18. Os compostos foram detectados pela absorção na região do U.V., a 350 nm.

Pela ausência de trabalhos relativos à metodologia de CLAR, em nosso meio, propusemo-nos a realizar a padronização desta técnica, com vistas à detecção e quantificação das aflatoxinas M₁ e M₂ em leite de vaca naturalmente contaminado e em leite de vaca artificialmente contaminado.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Foram utilizadas 10 amostras de leite cru, pasteurizado, isento de aflatoxinas.

Solventes

Metanol, acetonitrila (Lichrosolv), filtrados em membrana "Millipore", com porosidade de 1,0 μ (47 mm de diâmetro), ref. FALP 04700

Água desmineralizada e destilada, filtrada em filtro "Millipore", em membrana filtrante de 0,8 μ de poro (47 mm de diâmetro), ref. AAWP 04700.

Solução-padrão

Aflatoxina B₁, M₁, M₂ em benzeno — acetonitrila (98+2)

Fase móvel

Acetonitrila — água (35+65%), para produzir eluição e separação das aflatoxinas

Aparelho

Cromatógrafo automático líquido de alta resolução marca Hewlett Packard, com injetor automático (variável), mod. 1084 A, com sistema de gradiente, acoplado com detector variável, U.V.-visível-H.P., mod. 1030 B, com programador modelo 79850 A-LC, terminal HP, com frasco de 2 ml (HP)

Coluna

Lichrosorb RP 18-10 μ m, Hybar Ser-tigsaulle (Merck)

Método

O método básico para análise, bem como para determinar a concentração e pureza dos padrões das aflatoxinas M₁ e M₂ foi o descrito nas monografias da "Association of Official Analytical Chemists"¹.

Extração da toxina — Em um frasco Erlenmeyer de 500 ml foram colocados 75 ml de leite, que foi submetido ao seguinte tratamento: adição de 300 ml de metanol, agitação por 30 minutos; adição de 25 g de terra diatomácea, agitação por 30 minutos em agitador mecânico; filtração a vácuo em filtro contendo 1 cm de terra diatomácea; lavagem do Erlenmeyer e do filtrado com 75 ml de metanol; transferência do filtrado e do lavado para um funil de separação de 1.000 ml; adição de 225 ml de solução de cloreto de sódio a 4% e extração com 3 porções de 100 ml de hexano (agitação vigorosa para remover a gordura); descarte da fase

do hexano; extração com 3 porções de 100 ml de clorofórmio; centrifugação durante 10-15 minutos a 3.000 rpm, para quebrar a emulsão; mistura dos extratos clorofórmicos e lavagem com 300 ml de solução de cloreto de sódio a 4%; descarte da fase aquosa; evaporação do extrato clorofórmico em banho-maria até quase seca; transferência do resíduo quantitativamente com clorofórmio para um frasco de 4 ml; evaporação sob nitrogênio até resíduo. (Este resíduo foi guardado em geladeira até o momento de usar, sob proteção da luz.)

Cromatografia líquida de alta resolução — O resíduo obtido foi dissolvido e transferido para frasco do próprio aparelho com 2 ml de benzeno — acetonitrila (98+2). Esta solução foi injetada para identificar e quantificar as aflatoxinas. As aflatoxinas foram detectadas por absorção no U.V. a 350 nm, e quantificadas pela área dos picos obtidos comparada à área dos picos das soluções-padrão. Para calcular a concentração das aflatoxinas, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{Ax \times Cs \times Vs \times SD}{As \times Vx \times W} = \frac{\mu\text{g/l de aflatoxi-}}{\text{na M}}$$

Ax = área integrada da aflatoxina M₁ ou M₂ na amostra

Cs = concentração da aflatoxina M₁ ou M₂ padrão (μg/ml)

Vs = μl da solução-padrão injetados

SD = diluição final do extrato da amostra em μl

Vx = μl do extrato da amostra injetado

W = ml da amostra representada pelo volume do extrato utilizado para Cromatografia líquida de alta resolução

RESULTADOS

Com relação à CLAR, sob as condições descritas, conseguimos uma boa separação das aflatoxinas M₁, M₂ e B₁.

Várias tentativas foram feitas com sistemas de solventes de fase reversa. Inicialmente, tentamos um sistema de metanol-água, porém não conseguimos bons resultados. Quando testamos o sistema acetonitrila-água, observamos que a separação das aflatoxinas M e B₁ era melhor, mas o problema era a proporção de cada solvente. Estudos foram feitos e conseguimos bons resultados utilizando maior percentagem de água. O sistema acetonitrila-água (35 +

65%) foi o ideal. A primeira providência foi injetar soluções-padrão, separadamente, de cada uma das aflatoxinas para determinar o tempo de retenção (fig. 1, 2, 3)²⁰. Os tempos de retenção das toxinas foram excelentes e estão listados na tabela 1.

A separação das aflatoxinas B₁, M₁ e M₂ padrão, demonstrada no gráfico (fig. 4), foi resolvida em 10 minutos com detetor de absorção no U.V., a 350 nm.

Tanto a amostra como os padrões foram dissolvidos em benzeno — acetonitrila (98 + 2); o pico do solvente não interferiu no tempo de retenção de cada uma das aflatoxinas analisadas, como mostra a figura 5. Incluímos a aflatoxina B₁, na hipótese de se poder utilizar esta metodologia em amostras que possam conter aflatoxina B₁, além de M₁.

Foi feito teste de recuperação de aflatoxina M₁ em leite isento de aflatoxinas, ao qual foi adicionada solução-padrão na concentração conhecida.

A recuperação da aflatoxina M₁ foi de 87,5% e está demonstrada na tabela 2 e fig. 6.

Os resultados de recuperação com vários níveis de aflatoxina M₂ estão na tabela 3. A recuperação de aflatoxina M₂ foi feita em uma amostra de leite pasteurizado, isento de aflatoxinas (fig. 7).

O limite de detecção do método é de 0,2 ppb de aflatoxina M₁ e 0,1 ppb de aflatoxina M₂.

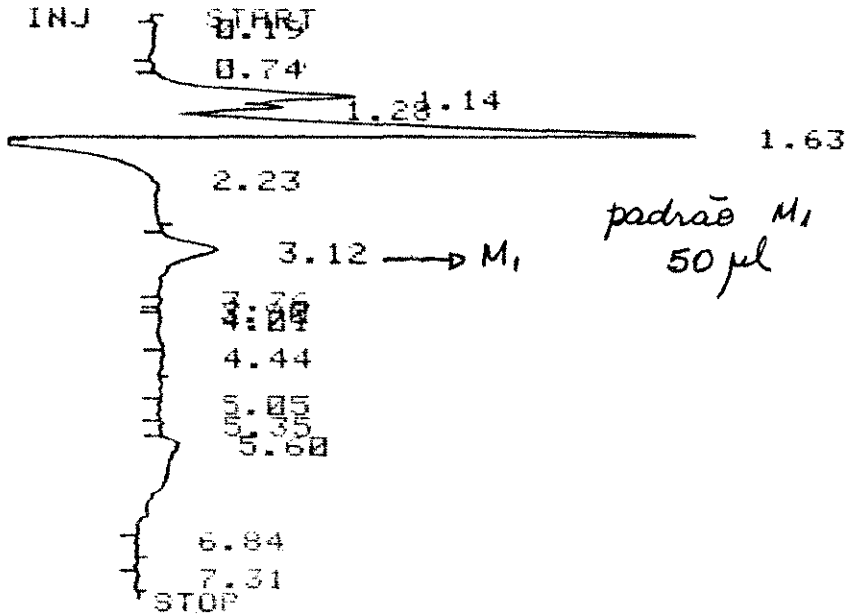
A precisão de resolução e quantificação por CLAR foi determinada por múltiplas injeções das soluções-padrão e extrato das amostras. O tempo de retenção e a área dos picos foram calculados por integração eletrônica.

CONCLUSÃO

Na literatura consultada, encontramos um único autor²¹ que descreve a utilização da absorção no U.V. com detetor para aflatoxina M₁; os demais autores utilizam a fluorescência e afirmam ser esta mais sensível.

Não obtivemos problemas de interferência, pois outros picos existentes nas amostras não saem no mesmo tempo de retenção das aflatoxinas em estudo.

Muitos autores afirmam que a detecção por fluorescência é muito mais sensível do que por absorção no U.V.; talvez por isso não tenhamos encontrado trabalhos na literatura nos quais se utilizou este detetor. Nossos resultados foram bons, reproduzíveis, porém não tão sensíveis como esperávamos.



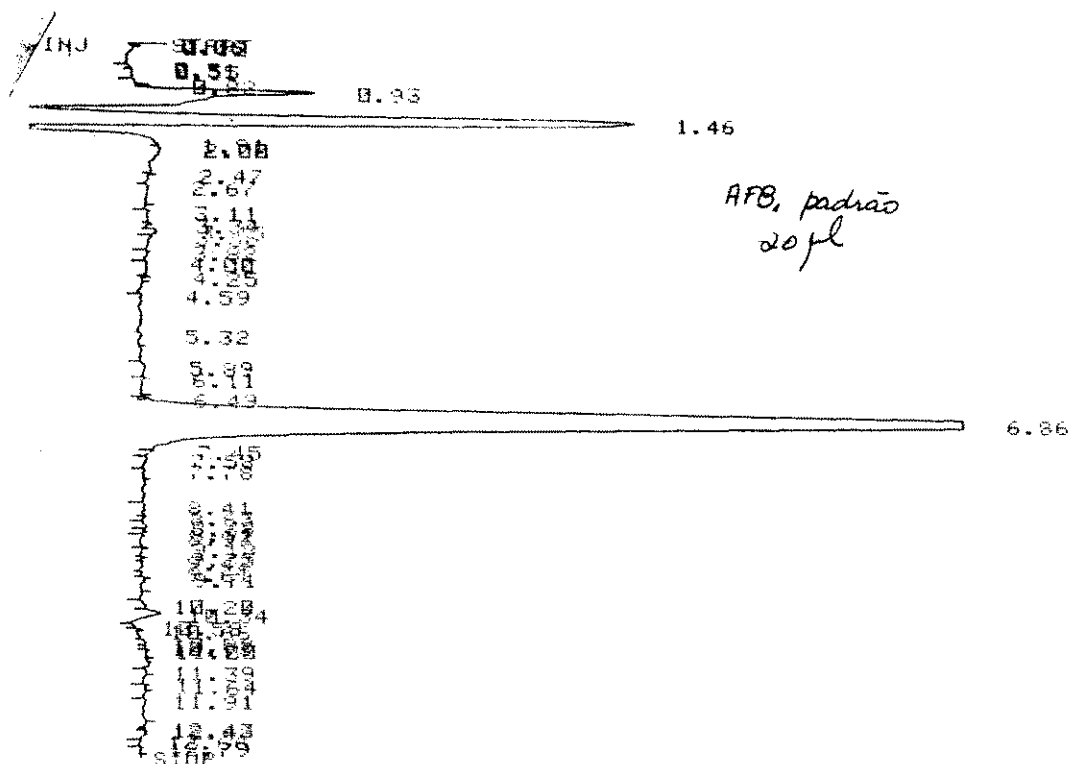
sp 1000H

AREA %

RT	AREA	AREA %
0.19	2164	5.561
0.74	1067	2.742
1.14	9810	25.229
1.28	3773	9.695
1.63	15780	40.499
2.23	2894	7.437
3.12	1377	3.538
5.68	2062	5.299

XF: 1.0000 E+ 0

FIGURA 1 — Tempo de retenção da aflatoxina M₁ padrão.



hp 1000A

AREA %

RT	AREA	AREA %
0.12	1670	1.361
0.91	1211	0.987
0.55	2715	2.212
0.62	2982	2.364
0.93	15540	12.660
1.46	24498	19.951
1.91	11130	9.067
2.00	10250	8.350
2.47	4713	3.840
2.67	1264	1.030
6.86	46300	37.720
10.34	563	0.459

XF: 1.0000 E+ 0

FIGURA 3 — Tempo de retenção da aflatoxina B₁ padrão.

SABINO, M.; PURCHIO, A. & ZORZETTO, M.A.P. — Separação e determinação das aflatoxinas M₁ e M₂ em amostras de leite de vaca por cromatografia líquida de alta resolução. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):87-99, 1984.

TABELA 1

Tempo de retenção das aflatoxinas M₂, M₁ e B₁

Aflatoxina	Tempo de retenção	
	(em minutos)	média (em minutos)
M ₂	2 min 0,76 s 2 min 0,79 s 2 min 0,69 s 2 min 0,83 s 2 min 0,82 s 2 min 0,72 s 2 min 0,79 s 2 min 0,92 s 2 min 0,78 s 2 min 0,79 s 2 min 0,87 s	2 min 0,79 s
M ₁	3 min 0,27 s 3 min 0,38 s 3 min 0,26 s 3 min 0,16 s 3 min 0,10 s 3 min 0,16 s 3 min 0,16 s 3 min 0,09 s 3 min 0,12 s 3 min 0,32 s 3 min 0,30 s 3 min 0,22 s 3 min 0,25 s 3 min 0,30 s	3 min 0,22 s
B ₁	6 min 0,78 s 6 min 0,76 s 6 min 0,83 s 6 min 0,86 s 6 min 0,81 s 6 min 0,59 s	6 min 0,77 s

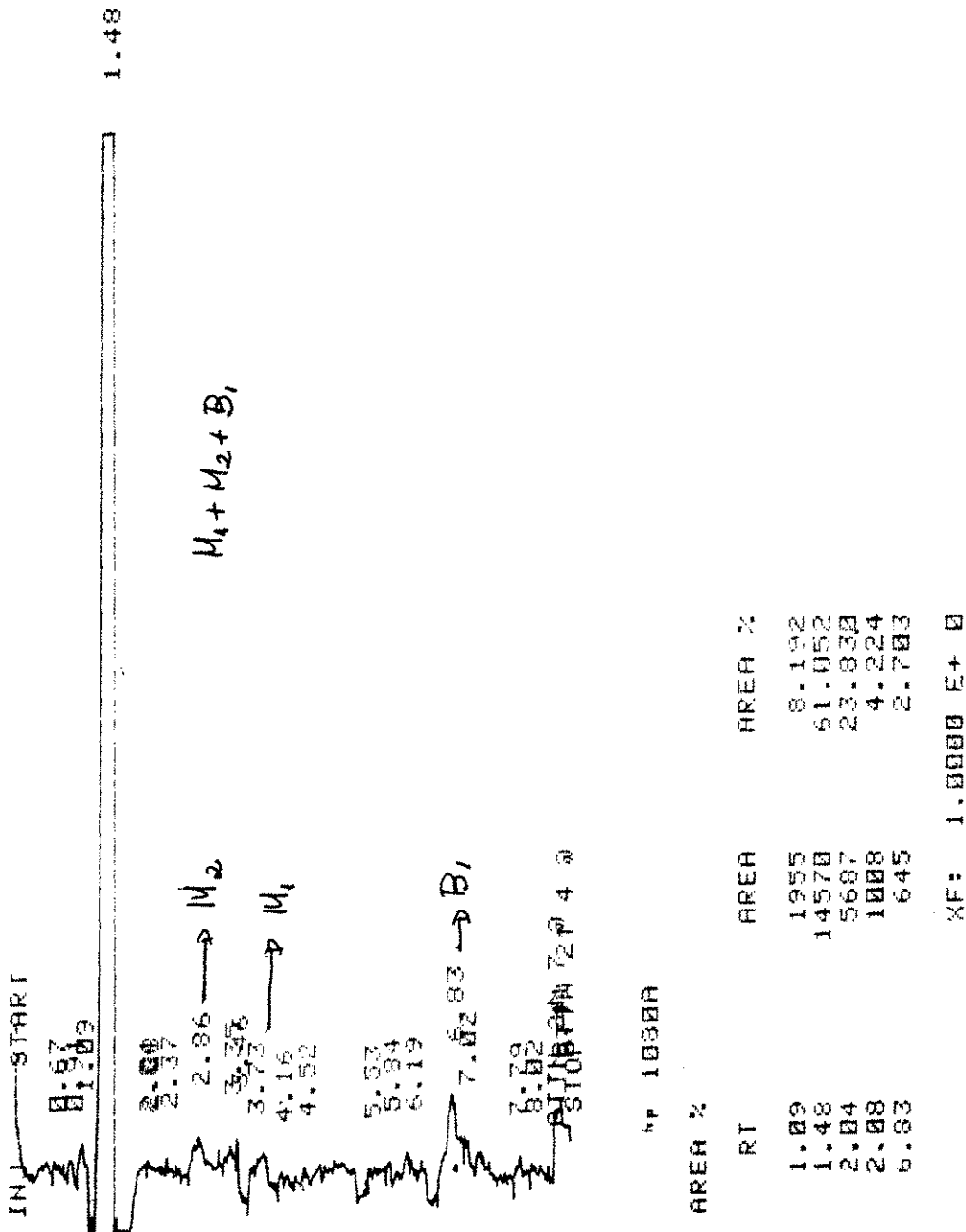


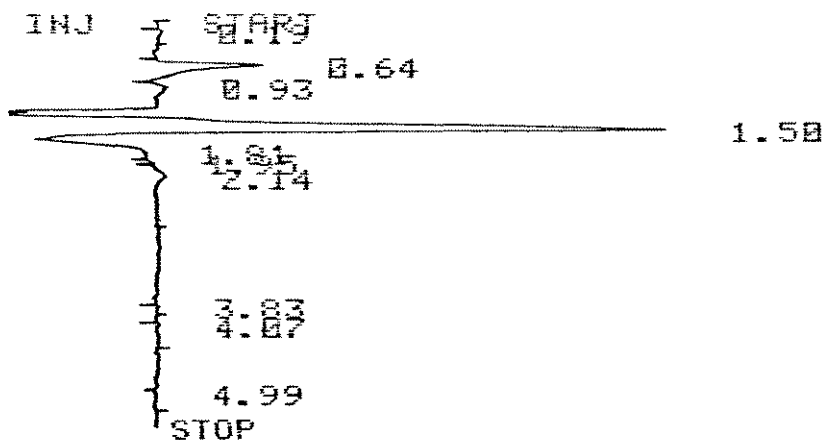
FIGURA 4 — Separação das aflatoxinas M₁, M₂ e B₁ por cromatografia líquida de alta resolução.

```

FLOW          2.00      2.01
%B            35.0      34.7
COLUMN P      109
MAX P         400
MIN P         0
S-TEMP A      30        30
S-TEMP B      25        29
OVEN TEMP     35        35
EXT SGHL
  
```

```

CHT SPD       1.00
ATTN 2†       4
ZERO          10.0
SLP SENS      0.05
AREA REJ      1000
OPTN          1
  
```



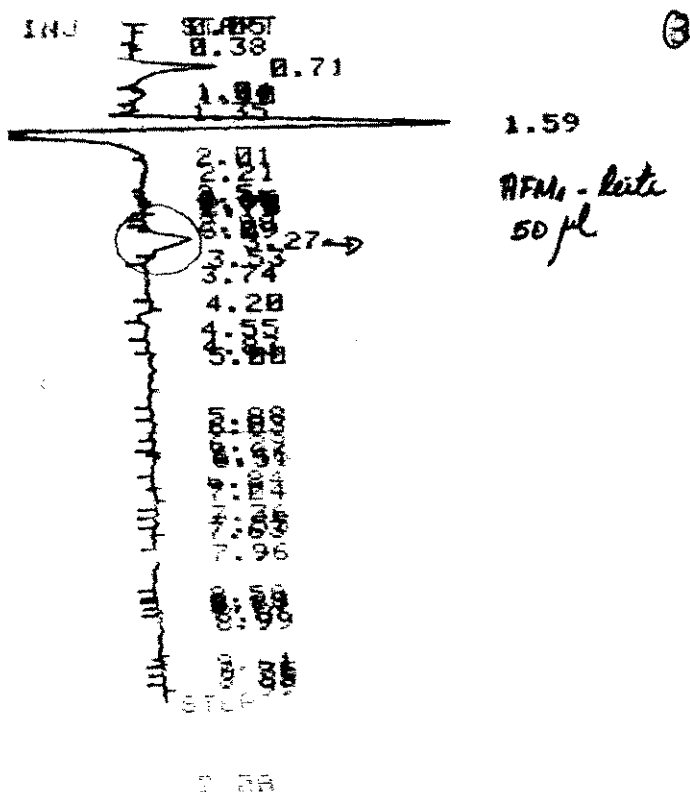
*p 1000A

AREA %

RT	AREA	AREA %
0.64	2578	10.845
0.93	6083	25.589
1.50	10070	45.726
1.81	1647	6.928
1.95	1022	4.299
2.14	1572	6.613

XF: 1.0000 E+ 0

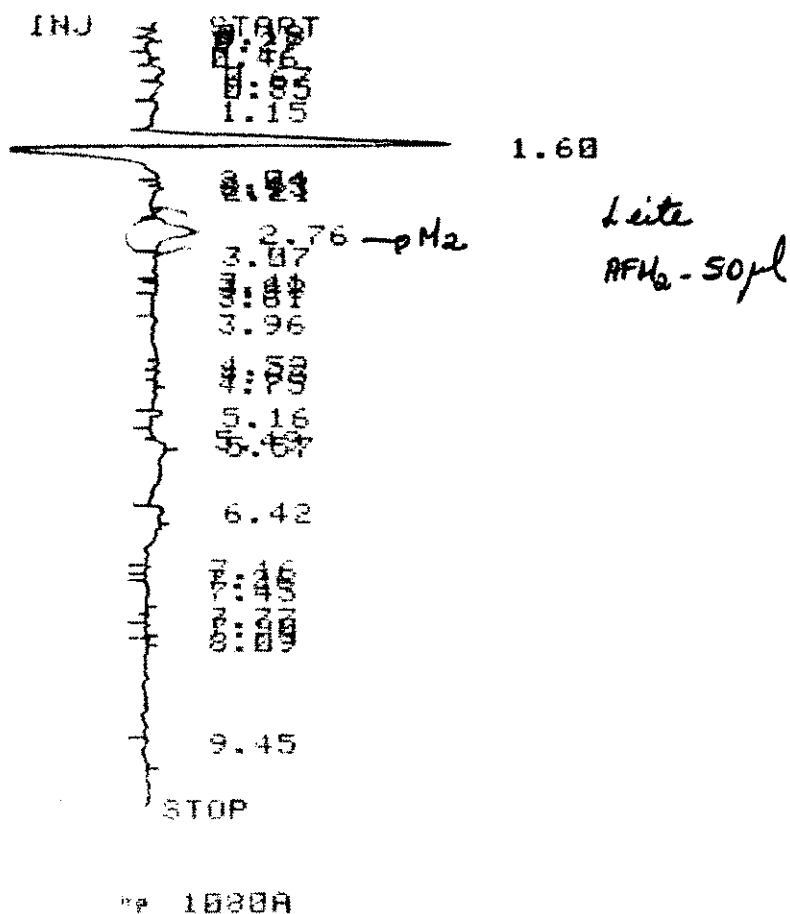
FIGURA 5 — Cromatograma do solvente benzeno-acetonitrila.



AREA %

RT	AREA	AREA %
0.05	15	0.042
0.38	20	0.056
0.71	3329	9.366
1.04	490	1.379
1.10	2923	8.224
1.35	2467	6.941
1.59	9690	27.826
2.01	6343	17.846
2.21	5829	16.400
2.56	340	0.957
2.65	269	0.757
2.70	203	0.571
2.75	135	0.380
2.98	19	0.053
3.00	28	0.079
3.27	1209	3.402
3.53	117	0.329
3.74	76	0.214
4.20	79	0.222

FIGURA 6 — Recuperação de aflatoxina M₁ adicionada ao leite cru, isento de aflatoxinas, por cromatografia líquida de alta resolução.



PT	AREA	AREA %
1.85	1362	7.601
1.15	3918	21.866
1.60	6826	38.096
2.04	3592	20.047
2.13	594	3.315
2.21	884	4.934
2.76	742	4.141

MF: 1.0000 E+ 0

FIGURA 7 — Recuperação de aflatoxina M₂ em amostra de leite de vaca, isento de aflatoxinas, por cromatografia líquida de alta resolução.

SABINO, M.; PURCHIO, A. & ZORZETTO, M.A.P. — Separação e determinação das aflatoxinas M_1 e M_2 em amostras de leite de vaca por cromatografia líquida de alta resolução. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):87-99, 1984.

TABELA 2

Recuperação da aflatoxina M_1 adicionada ao leite cru isento de aflatoxinas (0,22 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$)

Aflatoxina M_1		
Amostra n.º	Recuperação	
	($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	%
1	0,19	86,36
2	0,18	81,80
3	0,21	95,40
Média	0,1933	87,85

TABELA 3

*Recuperação da aflatoxina M_2 adicionada, em várias concentrações, a leite pasteurizado isento de aflatoxinas**

Aflatoxina M_2		
Adicionada $\mu\text{g}/100\text{ ml}$	Recuperação	
	$\mu\text{g}/100$	%
0,01	0,0101	101
0,02	0,0216	108
0,02	0,0194	97
0,04	0,0380	95
0,04	0,0430	109

* Análise feita anteriormente por cromatografia em camada delgada, método da A.O.A.C.¹.

RIALA6/578

SABINO, M.; PURCHIO, A. & ZORZETTO, M.A.P. — Separation and determination of aflatoxins M_1 and M_2 in samples of cow milk by high-performance liquid chromatography. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):87-99, 1984.

ABSTRACT: Aflatoxins M_1 , M_2 , and B_1 were completely separated by high-performance liquid chromatography in reversed-phase C-18 columns by using acetonitrile-water (35% + 65%) as eluting solvent and a flow rate of 2.0 ml/minute. Compounds were detected by ultraviolet absorbance at 350 nm. Peak height and retention time were reproducible. M_1 was determined at levels of 0.2 ppb or higher and M_2 at 0.1 ppb or higher. Recovery of 87.5% was found for M_1 and of 102% for M_2 .

DESCRIPTORS: aflatoxins M_1 and M_2 in cow milk, determination; cow milk, determination of aflatoxin M_1 and M_2 ; high-performance liquid chromatography.

SABINO, M.; PURCHIO, A. & ZORZETTO, M.A.P. — Separação e determinação das aflatoxinas M_1 e M_2 em amostras de leite de vaca por cromatografia líquida de alta resolução. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):87-99, 1984.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 12nd ed. Washington, D.C., A.C.A.C., 1975. p. 476. [itens 26083-26087]
2. BEEBE, R.M. & TAKAHASHI, D.M. — Determination of aflatoxin M_1 by high pressure liquid chromatography using fluorescence detection. *J. agric. Food Chem.*, 28:481-2, 1980.
3. BROWN, N.L.; NESHEIM, S.; STACK, M.E. & WARE, G.M. — Method for the determination of aflatoxin in animal tissue. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 56:1437-9, 1973.
4. FUKAYAMA, M.; WINTERLIN, W. & HSIEH, D.P.H. — Rapid method for analysis of aflatoxin M_1 in dairy products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 63:927-30, 1980.
5. GREGORY, J.F. & MANLEY, D. — High performance liquid chromatographic determination of aflatoxins in animal tissues and products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 64:144-51, 1981.
6. HUNT, D.C.; BOURDON, A.T.; WILD, P.J. & CROSBY, N.T. — Use of high performance liquid chromatography combined with fluorescence detection for the identification and estimation of aflatoxins and ochratoxin in food. *J. Sci. Food Agric.*, 29:234-8, 1978.
7. KIERMEIER, F. — Aflatoxin residues in fluid milk. *Pure appl. Chem.*, 35:271-3, 1973.
8. MASRI, M.S. — Estimation partition and column chromatographic separation of aflatoxin B_1 and M_1 . *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 47:61-4, 1970.
9. MITCHELL, D.J.; SOMERS, E.; CAMPBELL, A.D. & SALWIN, H. — Report of Subcommittee C on Recommendations for Official Methods. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 57:431, 1974.
10. PANALAKS, T. & SCOTT, P.M. — Sensitive silica gel-packed flowcell for fluorometric detection of aflatoxins by high pressure liquid chromatography. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 60:583-9, 1977.
11. PATTERSON D.S.P.; GLANCY, E.M. & ROBERTS, B.A. — The estimation of aflatoxin M_1 in milk using a two-dimensional thin-layer chromatographic method suitable for survey work. *Food Cosmet. Toxicol.*, 16:49-50, 1978.
12. PONS, W.A., Jr. — High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in corn. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 62:586-94, 1979.
13. PONS, W.A., Jr.; CUCULLU, A.F. & LEE, L.S. — Method for the determination of aflatoxin M_1 in fluid milk and milk products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 56:1431-6, 1973.
14. PONS, W.A., Jr. & FRANZ, A.O., Jr. — High performance liquid chromatography of aflatoxins in cottonseed products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 60:89-95, 1977.
15. PURCHASE, I.F.H. & STEYN, M. — Estimation of aflatoxin M_1 in milk. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 50:363-6, 1967.
16. ROBERTS, B.A. & ALLCROFT, R. — A note on the semi-quantitative estimation of aflatoxin M_1 in liquid milk by thin-layer chromatography. *Food Cosmet. Toxicol.*, 6:339, 1968.
17. SEIBER, J.N. & HSIEH, D.P.H. — Application of high-speed liquid chromatography to the analysis of aflatoxins. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 56:827-30, 1973.
18. SCHULLER, P.L.; VERHULSDONK, C.A.H. & PAULSCH, W.E. — Analysis of aflatoxin M_1 in liquid and powdered milk. *Pure appl. Chem.*, 35:291-6, 1973.
19. STUBBLEFIELD, R.D. — The rapid determination of aflatoxin M_1 in dairy products. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 56:800-2, 1979.
20. STUBBLEFIELD, R.D. & SHANNON, G.M. — Collaborative study of methods for the determination and chemical confirmation of aflatoxin M_1 in dairy products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 57:852-7, 1974.
21. STUBBLEFIELD, R.D. & SHOTWELL, O.L. — Reverse phase analytical and preparative high pressure liquid chromatography of aflatoxins. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 60:784-790, 1977.
22. TAKAHASHI, D.M. & BEEBE, R.M. — Reversed phase high performance liquid chromatographic procedure for determining aflatoxins in foods and beverages using fluorescence detection. In: SYMPOSIUM ON THE ANALYSIS OF FOODS AND BEVERAGES BY HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY, Honolulu, 1979. *Liquid chromatographic analysis of food and beverages*. Proceedings, edited by G. Charalambous, New York, Academic press, 1979. v. 1, p. 101.
23. TRUCKSESS, M.W. — Derivative procedure for identification of aflatoxin M_1 on a thin layer chromatogram. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 59:722-3, 1976.
24. TRUCKSESS, M.W. & STOLOFF, L. — Extraction, cleanup, and quantitative determination of aflatoxins B_1 and M_1 in beef liver. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 62:1080-2, 1979.

SABINO, M.; PURCHIO, A. & ZORZETTO, M.A.P. — Separação e determinação das aflatoxinas M₁ e M₂ em amostras de leite de vaca por cromatografia líquida de alta resolução. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):87-99, 1984.

25. TUINSTRAN, L.G.M. & BRONSQUEEST, M. — Determination of aflatoxin M₁ in milk at the parts per trillion level. *J. chromatogr.*, 111:448-451, 1975.
26. VAN EGMOND, H.P.; PAULSCH, W.E. & SCHULLER, P.L. — Confirmatory test for aflatoxin M₁ on a thin layer plate. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 61:809-12, 1978.
27. WINTERLIN, W.; HALL, G. & HSIEH, D.P.H. — On-column chromatographic extraction of aflatoxin M₁ from milk and determination by reversed phase high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 51:1873-4, 1979.
28. ZIMMERLI, B. — Verbesserung der Nachweisgrenze von Aflatoxinen in der Hochdruck-Flüssigkeits-chromatographie durch Verwendung eines kieselgefüllten fluoreinzendetektors. *J. chromatogr.*, 131:458-63, 1977.

Recebido para publicação em 8 de fevereiro de 1984.

SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ E G₂ POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO *

Myrna SABINO **
Maria Ângela P. ZORZETTO **

RIALA6/579

SABINO, M. & ZORZETTO, M.A.P. — Separação e quantificação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ por cromatografia líquida de alta resolução. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):101-108, 1984.

RESUMO: É descrito um método para determinação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ por cromatografia líquida de alta resolução. As aflatoxinas foram extraídas, cromatografadas em coluna de fase reversa, e detectadas no ultravioleta a 350 nm. Nos testes efetuados, a recuperação variou de 92 a 106%. O método foi aplicado em dez amostras de farelo de amendoim e em amendoim em grão. O limite de detecção foi de 2 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

DESCRIPTORIOS: aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, determinação; amendoim, farelo de amendoim, determinação de aflatoxinas; cromatografia líquida de alta resolução.

INTRODUÇÃO

Cromatografia líquida de alta resolução (CLAR) está sendo usada para separação e quantificação de aflatoxinas em vários tipos de alimentos, tais como grãos^{6,9}, amendoim e pasta de amendoim^{2,7}, milho¹¹, vinhos¹² e em culturas de fungos^{10,12}. Isto porque esta técnica veio solucionar diversos problemas analíticos por apresentar maior velocidade de análise, maior resolução e maior sensibilidade⁵.

Durante a última década, a pesquisa de aflatoxinas em produtos agrícolas tem sido expandida para várias espécies. O método analítico empregado tem sido a cromatografia em camada delgada, que se baseia na separação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em placas de sílica gel, quantificadas por comparação visual da intensidade de fluorescência das manchas da amostra e padrão, ou por fluordensitometria do cromatograma¹.

Essas técnicas são sensíveis; entretanto, o recente avanço em CLAR mostrou que melhor separação e quantificação podem ser obtidas por esta última técnica^{4,10}.

Os métodos disponíveis para determinar aflatoxinas por CLAR, referidos na literatura, são abundantes e a maioria deles utiliza como detetor a fluorescência.

O método por nós proposto é uma combinação da técnica de PREGNOLATTO & SABINO⁸, com modificação na extração, utilizando CLAR com detetor ultravioleta a 350 nm. As aflatoxinas são resolvidas por cromatografia líquida de fase reversa (RP 18, tendo como fase móvel acetonitrila — água (35 + 65%).

O objetivo de nosso trabalho foi estabelecer e padronizar uma técnica por CLAR para separar e determinar as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, visto que oferece as vantagens de velocidade, boa resolução, precisão, e sensibilidade.

MATERIAL

Foram utilizadas dez amostras de amendoim e de farelo de amendoim para testar o método.

* Realizado na Seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Solventes

Metanol p.a.
Clorofórmio p.a.
Solução de cloreto de sódio a 4%
Hexano p.a.
Metanol Lichrosolv
Acetonitrila Lichrosolv

Água destilada, filtrada em filtro *Millipore* em membrana filtrante de 0,8 μ de poro (47 mm de diâmetro) ref. AAWP, 04700.

Soluções-padrão das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ em metanol Lichrosolv

Fase móvel

A — água destilada
B — acetonitrila + metanol (3 + 2)

sendo $\begin{cases} A = 65\% \\ B = 35\% \end{cases}$

Aparelho

Cromatógrafo automático líquido de alta resolução, com injetor automático (variável), mod. 1084 A, com sistema gradiente, acoplado com detetor variável, U.V., visível, H.P., mod. 1030 B, com programador mod. 79850 A-LC, terminal HP

Coluna: Lichrosorb RP 18 — 10 um (Merck)

Frasco: de 2 ml HP

MÉTODO

A determinação das aflatoxinas envolve as seguintes operações:

a) Preparo da amostra

Descascar (se for o caso) e triturar a amostra. Proceder a uma perfeita homogeneização da mesma.

b) Extração das aflatoxinas

Pesar 30 g da amostra e transferir para um frasco Erlenmeyer de 250 ml com tampa esmerilhada. Adicionar à amostra 10 ml de água e homogeneizar com bastonete de vidro; adicionar 100 ml de clorofórmio, fechar o frasco e agitar violentamente durante 30 segundos. Continuar agitando em agitador mecânico por 30 minutos ou mais. Filtrar o extrato em papel de filtro Whatman n.º 1 ou equivalente. A filtração de certos materiais, particularmente amendoim, pode ser muito lenta e difícil. Para evitar este problema, é conveniente filtrar através de uma camada de terra diatomácea, tal como "Celite". Minimizar a evaporação do clorofórmio cobrindo o funil com vidro de relógio e folha de papel de alumínio. Evaporar o filtrado até o resíduo. Dissolver este resíduo em 50 ml de metanol p.a., transferir para funil de

separação de 500 ml. Adicional 50 ml de cloreto de sódio a 4% e agitar. Extrair com 3 porções de 50 ml de hexano cada para remover a gordura. Desprezar o hexano. Extrair com duas porções de 50 ml de clorofórmio. Evaporar o extrato clorofórmico até o resíduo. Transferir o resíduo quantitativamente com clorofórmio para frasco de 2 ml, evaporar sob gás de nitrogênio até resíduo. Guardar em geladeira, sob proteção da luz, até o momento de usar.

c) Cromatografia líquida de alta resolução

Dissolver o resíduo obtido e transferir para o frasco do próprio aparelho com 2 ml de metanol Lichrosolv. Injetar esta solução no cromatógrafo para identificação e quantificação das aflatoxinas.

Programação de operação-coluna (RP 18)

Fase móvel acetonitrila-metanol (3+2)
— água (35+65%)

Detetor: U.V. (350 nm)

Fluxo: 2,0 ml/minuto

Injeção: 50 μ l

Sensibilidade: 0,05

Atenuação: ATTN 2

Temperatura do forno: ambiente

As aflatoxinas são detectadas por absorção no U.V. a 350 nm, e quantificadas pela área dos picos obtidos comparada à área dos picos das soluções-padrão.

As aflatoxinas são detectadas por absorção no U.V. a 350 nm, e quantificadas pela área dos picos obtidos comparada à área dos picos das soluções-padrão, segundo a fórmula:

$$\frac{A_x \times X \times C_s \times V_s \times X \times S_D}{A_s \times X \times V_x \times X \times W} = \text{aflatoxinas } (\mu\text{g/kg})$$

A_x = área integrada da aflatoxina (B₁, B₂, G₁, G₂)

C_S = concentração da aflatoxina-padrão (μ g/ml)

V_s = μ l da solução-padrão injetada

S_D = diluição final do extrato da amostra em μ l

A_s = área integrada da solução-padrão

V_x = μ l do extrato da amostra injetada

W = peso da amostra representado pelo volume do extrato utilizado por CLAR

RESULTADOS

As 4 aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram resolvidas por CLAR em 15 minutos e detectadas no U.V. a 350 nm. Os 4 compostos

puderam ser medidos com boa resolução e precisão.

Inicialmente foi injetada, no cromatógrafo, cada uma das aflatoxinas-padrão a fim de ser determinado o tempo de retenção (TR), como está demonstrado na tabela 1 e figuras 3 e 4. Posteriormente, foi injetada a mistura das aflatoxinas-padrão (fig. 1).

O método foi avaliado em amostras de farelo de amendoim (fig. 5) e em amendoim em grão; os resultados estão na tabela 2. Testes de recuperação foram efetuados, variando esta de 92 a 106%. Tanto a amos-

tra como os padrões foram dissolvidos em metanol Lichrosolv e o pico do solvente não interferiu no TR de cada uma das aflatoxinas analisadas (fig. 2).

A precisão de resolução e quantificação por CLAR foi determinada por múltiplas injeções das soluções-padrão e do extrato das amostras. O tempo de retenção e área dos picos foram calculados por integração eletrônica. Não houve problemas de interferência, pois outros picos existentes nas amostras não apresentavam o mesmo TR das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ ou G₂.

TABELA 1

Tempo de retenção das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂

Aflatoxina	RT*	Média
B ₁	10 min 70 s	10 min 74 s
	10 min 79 s	
B ₂	8 min 59 s	8 min 54 s
	8 min 49 s	
G ₁	7 min 57 s	7 min 56 s
	7 min 54 s	
	7 min 58 s	
G ₂	6 min 10 s	6 min 05 s
	6 min 09 s	

* RT = tempo de retenção.

TABELA 2

Quantificação das aflatoxinas analisadas (µg/kg)

Amostras	Aflatoxina (µg/kg)			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
1. ^a — Farelo de amendoim	448	310	235	299
2. ^a — Farelo de amendoim	193	N.D.*	N.D.*	430
3. ^a — Amendoim em grão	605	530	633	766

* N.D. = não aparecimento do pico no cromatograma.

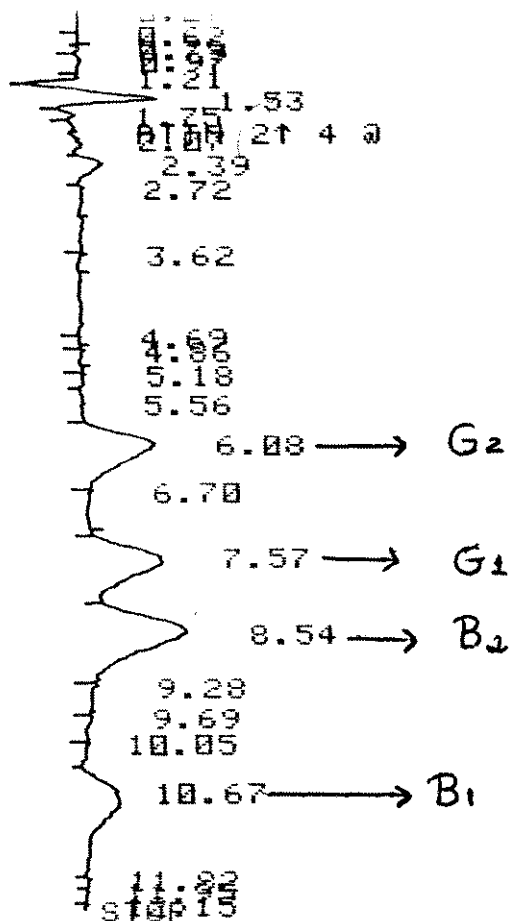


FIGURA 1 — Separação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

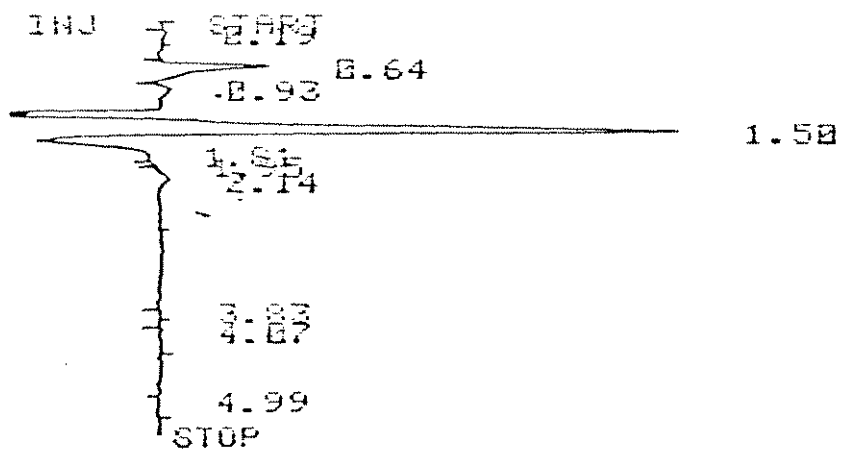
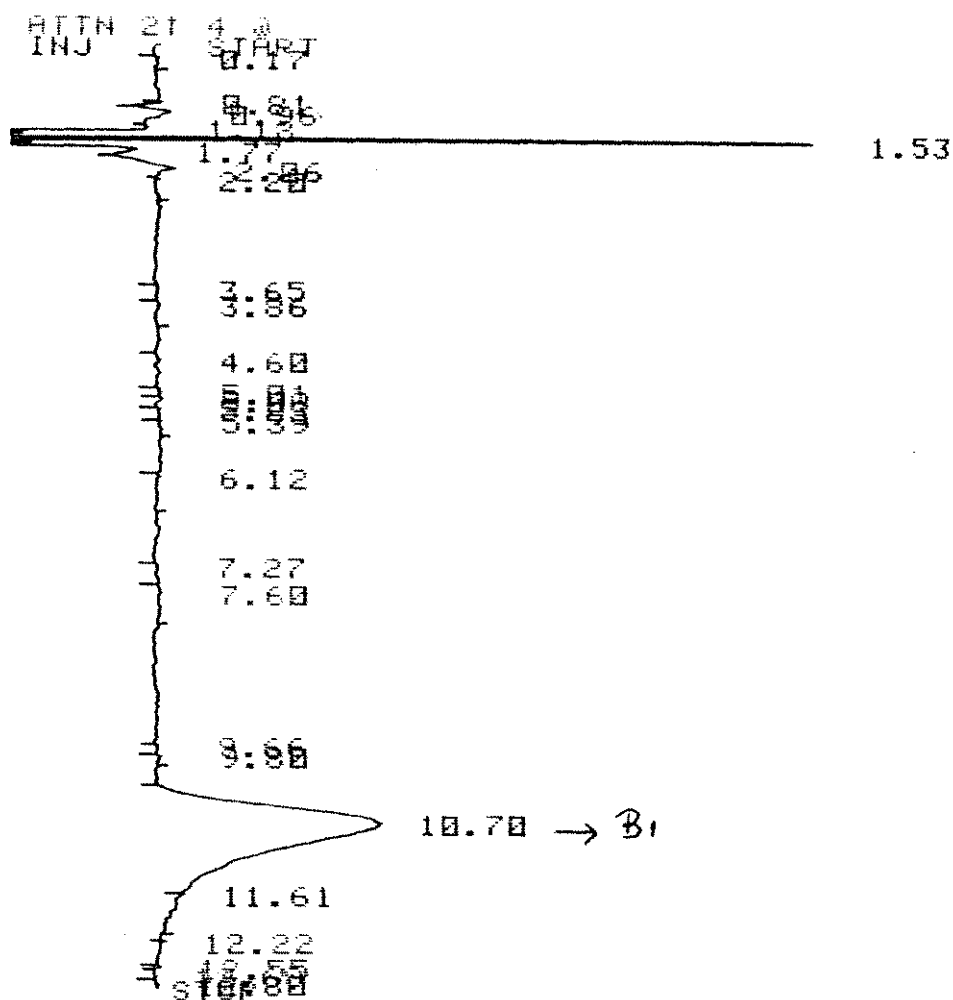


FIGURA 2 — Cromatograma do solvente (metanol).



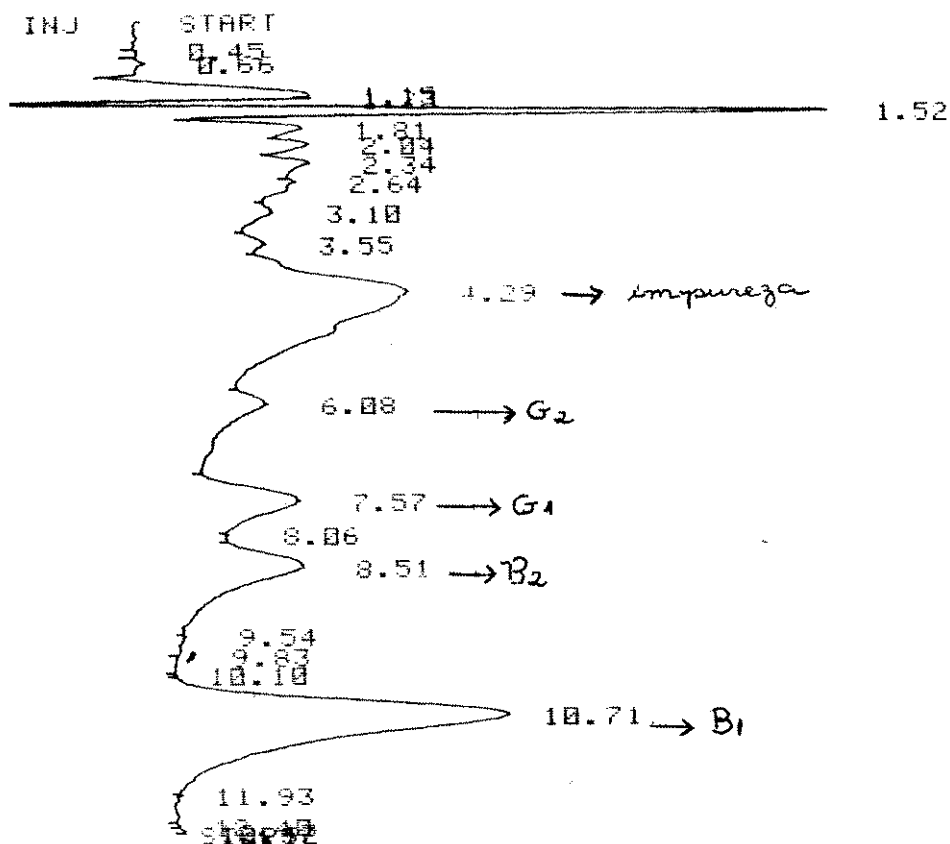
hp 10800

AREA %

RT	AREA	AREA %
0.96	4817	10.510
1.18	3490	7.615
1.53	16420	35.827
1.77	2881	6.286
2.06	2924	6.380
10.70	15300	33.383

XF: 1.0000 E+ 0

FIGURA 4 — Cromatograma da aflatoxina B₁ padrão



hp 1080A

AREA %	RT	AREA	AREA %
0.493	0.66	1645	0.493
1.130	1.10	2004	1.130
0.500	1.19	2100	0.500
5.190	1.81	17030	5.190
2.765	2.04	9230	2.765
2.813	2.34	9390	2.813
3.607	2.64	12040	3.607
3.640	3.10	12150	3.640
3.930	3.55	13120	3.930
3.047	4.29	10170	3.047
22.790	6.08	76100	22.790
10.656	7.57	35570	10.656
8.238	8.06	27500	8.238
0.380	8.51	1267	0.380
11.021	8.51	36790	11.021
2.512	9.54	3386	2.512
1.478	9.83	4935	1.478
0.305	10.10	1017	0.305
14.368	10.71	47960	14.368

XF: 1.0000 E+ 0

FIGURA 5 — Cromatograma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

DISCUSSÃO

Alguns autores preferem a detecção das aflatoxinas por fluorescência, por ser muito mais sensível do que por absorção no ultravioleta. NESHEIM³ relatou que quando empregou detector ultravioleta em CLAR obteve bons resultados com 2 — 10 ng das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ por injeção. Posteriormente, através do uso de fluorescência como detector, quantificou, na concentração de 0,2 ng, as aflatoxinas B₂ e G₂ diretamente, e B₁ e G₁, após conversão para B₂ e G_{2a}.

CONCLUSÃO

Os resultados foram considerados bons, reproduzíveis, apesar de ter sido utilizado como detector o ultravioleta. O limite de detecção foi de 2 ppb.

O método CLAR foi satisfatório. Não se justifica porém a substituição da cromatografia em camada delgada, que produz bons resultados e não requer equipamento e acessórios de alto custo, por CLAR que está fora de nossa realidade.

RIALA 6/579

SABINO, M. ZORZETTO, M.A.P. — A method for the separation and determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ by high-performance liquid chromatography. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):101-108, 1984.

ABSTRACT: A method for determining aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ through high-performance liquid chromatography is described. The aflatoxins were extracted and passed through a reverse-phase chromatography with detection in the ultraviolet spectrum at 350 nm. Recoveries of 92 to 106% were obtained. The method was employed in ten samples of peanut flour. The detection limit was 2 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

DESCRIPTORS: aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂, determination; peanut, peanut flour, determination of aflatoxins; high-performance liquid chromatography, use for determining aflatoxins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 12nd ed. Washington, AOAC, 1975. p. 467-471.
2. HURST, W.J. & TOOMEY, P.B. — Determination of aflatoxins in peanut products using reverse phase HPLC. *J. Chromatogr. Sci.*, 16:372-6, 1978.
3. NESHEIM, S. — Methods of aflatoxin analysis. In: MATERIALS RESEARCH SYMPOSIUM, 9th, Gaithersburg, Md., 1978. *Trace organic analysis: a new frontier in analytical chemistry*. Proceedings, edited by H.S. Hertz & S.N. Shesler, Washington, D.C., National Bureau of Standards, 1979. p. 355-72. (NBS special pub. 519)
4. PANALAKS, T. & SCOTT, P.M. — Sensitive silica gel-packed flowcell for fluorometric detection of aflatoxins by high-pressure liquid chromatography. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 60:583-9, 1977.
5. PONS, W.A., Jr. — Resolution of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ by high-pressure liquid chromatography. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 59:101-5, 1976.
6. PONS, W.A., Jr. & FRANZ, A.O., Jr. — High performance liquid chromatography of aflatoxins in cottonseed products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 60:89-95, 1977.
7. PONS, W.A., Jr. & FRANZ, A.O., Jr. — High pressure-liquid chromatographic determination of aflatoxins in peanut products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 61:793-800, 1978.
8. PREGNOLATTO, W. & SABINO, M. — Pesquisa e dosagem de aflatoxina em amendoim e derivados e em outros cereais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30:65-71, 1970.
9. RAO, G.H.R. & ANDES, M.W. — Aflatoxin detection by high-speed liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 84:402-6, 1973.
10. SEIBER, J.N. & HSIEH, D.P.H. — Application of high-speed liquid chromatography to the analysis of aflatoxins. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 56:827-30, 1973.
11. SEITZ, L.M. — Comparison of methods for aflatoxin analysis by high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 104:81-9, 1975.
12. TAKAHASHI, D.M. — High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in wines and other liquid products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 60:799-804, 1977.

Recebido para publicação em 8 de fevereiro de 1984.

NÍVEIS DE NITRATOS EM BETERRABA *

Walkyria H. LARA **
Mickiko Y. TAKAHASHI **
Helena Y. YABIKU **

RIALA6/580

LARA, W.H.; TAKAHASHI, M.Y. & YABIKU, H.Y. — Níveis de nitratos em beterraba. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):109-113, 1984.

RESUMO: Foram determinados os níveis de nitratos em beterraba *in natura*, beterraba em pó, beterraba liofilizada e em corantes de beterraba. Estes níveis variaram de 391 a 34.187 mg/kg, sendo maiores no corante líquido, beterraba em pó e beterraba liofilizada. Os dados mostram a necessidade de uma revisão no processo de obtenção do corante para que os níveis de nitrato sejam reduzidos e/ou o estabelecimento de um limite de nitratos na Norma de Identidade e Qualidade do Corante Vermelho de Beterraba.

DESCRITORES: nitratos em beterraba, determinação; corante Vermelho de beterraba, determinação de nitratos; beterraba (*Beta vulgaris*), determinação de nitratos.

INTRODUÇÃO

Os vegetais possuem um teor natural de nitratos que constitui fonte de nitrogênio necessário ao seu desenvolvimento. Em recente trabalho feito para avaliar os teores de nitratos em hortaliças⁴, foram encontrados valores consistentemente altos em amostras de espinafre e de couve.

Beterraba (*Beta vulgaris*) é raiz utilizada na alimentação e para produção de açúcar em alguns países europeus e na produção de corante alimentício. Sabe-se que este é um dos vegetais que apresenta alto teor de nitratos^{5, 7}.

O corante natural Vermelho de Beterraba é um dos corantes naturais cujo uso é permitido em alimentos pela legislação brasileira¹. Este corante é extraído das raízes de beterraba a partir do suco obtido por expressão ou por extração aquosa e posterior purificação. Apresenta-se em solução diluída ou concentrada e em forma de pó. Durante o processo de obtenção a maior parte dos com-

ponentes naturais, como sais, açúcares e proteínas, é removida.

Podem estar presentes, contudo, ácidos adicionados para o controle do pH e estabilização, tais como ácido cítrico, láctico, ascórbico e aquelas substâncias que não foram removidas.

Nas monografias referentes ao corante Vermelho de beterraba, publicadas pela FAO (1963)⁶, WHO (1976)² e FAO (1978)³, não consta o teor de nitratos como impureza do corante. Na reunião da "Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives", realizada em 1982, foi discutido o estabelecimento de um limite máximo de 10 mg/kg para essa impureza, limite este ainda não estabelecido.

Para estabelecer a correlação dos teores de nitratos na beterraba e no corante dela obtido, foram feitas várias determinações em diferentes tipos de amostra: beterraba *in natura*, beterraba em pó e beterraba liofilizada. Em amostras de um mesmo lote foi

* Realizado na Seção de Aditivos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

feita a determinação de nitrato nas diversas fases de liofilização. O método usado foi o descrito por LARA et alii⁴.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 25 amostras de beterraba *in natura*, adquiridas nas feiras livres da cidade de São Paulo; 4 amostras de corante líquido obtidas da beterraba *in natura*; 12 amostras de beterraba em pó e 3 amostras de beterraba liofilizada adquirida de firmas comerciais.

Reagentes

Para obtenção do extrato

Solução de cloreto de cádmio: dissolver 50 g de $CdCl_2$ e 50 g de $BaCl_2$ em água destilada e completar o volume até 1 litro, em balão volumétrico. Ajustar o pH igual a 1, com ácido clorídrico.

Solução de hidróxido de sódio a 10% p/v

Para obtenção da coluna

Solução de sulfato de cádmio a 20% p/v

Zinco em bastão

Solução-tampão (pH 9,6-9): adicionar 20 ml de ácido clorídrico concentrado a 500 ml de água destilada. Agitar e adicionar 50 ml de hidróxido de amônia concentrado. Completar o volume de 1.000 ml.

Para desenvolvimento da cor

Solução de alfa-naftol: aquecer 360 ml de água destilada e 50 ml de ácido acético a 50°C, e transferir para um frasco escuro contendo 0,25 g de ácido sulfanílico, Agitar até dissolver e adicionar 0,20 g de alfa-naftol, agitando bem. Esfriar à temperatura ambiente e adicionar 90 ml de solução de hidróxido de amônio a 10%. O pH desta solução deve ser $4,0 \pm 0,5$.

Preparação da coluna

Preparar um coluna estirando uma das pontas de um tubo de 1,5 cm de diâmetro e 12 cm de comprimento. Adaptar ao topo da coluna um funil de separação de 50 ml, com haste de 1 mm de diâmetro interno e 25 cm de comprimento. Colocar de 2 a 3 bastões de zinco em um béquer contendo cerca de 100 ml de solução de sulfato de cádmio a 20%. Remover, com uma vareta de vidro, o depósito esponjoso formado depois de 2 a 3 horas, colocando-o em um béquer contendo água destilada. Transferir o cádmio formado com o auxílio de aproximadamente 200 ml de água destilada para o copo do liquidifi-

cador e triturar durante 1 a 2 segundos. Passar em peneira de 20 a 40 malhas. Colocar na extremidade afilada da coluna um pouco de lã de vidro seguida de uma camada de 1 cm de areia e transferir o cádmio para até quase o topo da mesma, mantendo-a sempre com água. Adaptar o funil de separação à coluna através de uma rolha de cortiça para prevenir a entrada de ar na coluna, mantendo-a sempre com água.

Antes da determinação do nitrato, lavar a coluna com 25 ml de HCl 0,1N, em seguida com 50 ml de água destilada e, finalmente, com 25 ml de solução-tampão diluída a 1:9 com água destilada.

Note que, quando o cádmio esponjoso é mantido debaixo d'água, sua atividade decresce depois de 24 horas. A eficiência de redução da coluna deve ser sempre controlada. Esta pode ser regenerada por passagens sucessivas de porções de HCl 0,1N, água e tampão, como descrito acima.

Eficiência da coluna: A eficiência da coluna é testada passando-se soluções-padrões de $NaNO_2$ através da coluna, determinando-se a quantidade de nitrito, de acordo com o método descrito adiante, e calcula-se a porcentagem de recuperação. Os dados obtidos com a coluna por nós usada estão configurados na tabela 1.

Quando a recuperação for inferior a 90%, regenerar a coluna da seguinte maneira: desmontar a coluna e transferir o cádmio para um béquer contendo HCl 2N e deixar por um minuto. Em seguida montar a coluna novamente, passando 50 ml de água destilada e 25 ml de solução-tampão 1:9.

Curva padrão de nitrito de sódio

Pesar 0,46 g de $AgNO_3$, e dissolver em 100 ml de água destilada quente. Transferir a solução obtida e as águas de lavagem correspondentes às três lavagens com 30 ml de água destilada para um balão volumétrico de 1.000 ml. Pesar 0,25 g de NaCl e colocar no balão, completando o volume com água destilada; agitar. Deixar descansar. Pipetar 5 ml do sobrenadante e transferir para um balão volumétrico de 100 ml, completando o volume com água destilada. Um mililitro desta solução corresponde a 10 microgramas de $NaNO_2$.

Pipetar alíquotas de 0,25 a 10 ml desta solução para balões volumétricos de 25 ml. Adicionar 5 ml de solução-tampão e 10 ml do reagente para desenvolver cor. Completar o volume com água. Colocar os balões à temperatura de 25 a 30°C, durante 30 minutos, para desenvolvimento da cor. Resfriar à temperatura ambiente e ler em espectrofotômetro em cela de 1 cm, a 474 nm, usando como branco uma solução contendo 10 ml do reagente para desenvolver cor, 5 ml do tampão, e água destilada.

Com os valores obtidos construir a curva-padrão.

Determinação de nitratos

Pesar 10 g da amostra de beterraba (no caso de beterraba em pó e beterraba liofilizada, pesar 1 g da amostra, não havendo a necessidade de triturar), transferir para o copo do liquidificador e triturar com o auxílio de 25 ml de água. Transferir para um balão volumétrico de 200 ml com o auxílio de 50 ml de água, lavando o copo do liquidificador e adicionar 50 ml da solução de CdCl₂. Agitar e deixar descansar por uma hora, agitando ocasionalmente.

Adicionar 10 ml de solução de hidróxido de sódio. Completar o volume com água e filtrar imediatamente em papel de filtro isento de nitrito. O filtrado está pronto para ser passado na coluna de cádmio.

Pipetar 20 ml (5 ml se for beterraba em pó ou liofilizada) da solução desproteïnizada

para um béquer de 150 ml e adicionar 5 ml da solução-tampão. Colocar o conteúdo no funil de separação e passar pela coluna de cádmio a uma velocidade de 5 ml/min., rejeitando os primeiros 10 ml. Passar água destilada através da coluna, recolhendo o eluado em balão volumétrico de 100 ml até atingir esse volume, tomando cuidado para que a coluna não seque.

Pipetar 10 ml (5 ml se for beterraba em pó ou liofilizada) do eluado para um balão volumétrico de 25 ml, adicionar 5 ml da solução-tampão e 10 ml do reagente para desenvolver cor. Deixar em banho-maria a 25-30°C, durante 30 minutos. Esfriar à temperatura ambiente e fazer a medida espectrofotométrica, em cela de 1 cm, a 474 nm, usando como branco uma solução contendo 10 ml do reagente para desenvolver cor, 5 ml do tampão e 10 ml de água destilada.

Calcular o valor de nitrito, usando a curva-padrão. Para obter o valor de nitrato na amostra, multiplique o valor encontrado pelo fator 1,231.

TABELA 1

Eficiência da coluna na recuperação de nitritos e nitratos

Quantidade de NaNO ₃ passada na coluna	Valor teórico de NaNO ₃ correspondente a NaNO ₂	Valor encontrado em NaNO ₂	Recuperação NaNO ₂
μg	μg	μg	%
4	3,24	3,33	102,7
8	6,48	6,66	102,7
12	9,72	9,66	99,3
20	16,20	16,60	102,4
40	32,40	32,66	101,7
56	45,36	46,32	102,1

TABELA 2

Teores de nitratos em NaNO₃

Amostra n.º	Beterraba <i>in natura</i> mg/kg	Corante líquido de beterraba mg/kg	Beterraba em pó mg/kg	Beterraba liofilizada mg/kg
1	931	12.446	24.710	19.717
2	1.474	12.723	23.721	34.187
3	1.872	17.660	21.613	24.515
4	3.020	18.572	31.990	
5	1.299		19.561	
6	391		16.033	
7	2.405		18.858	
8	1.341		16.679	
9	2.179		18.793	
10	1.215		13.632	
11	1.005		21.562	
12	4.176		21.613	
13	1.500			
14	4.207			
15	3.584			
16	4.050			
17	1.495			
18	2.939			
19	3.554			
20	3.155			
21	2.954			
22	3.589			
23	4.000			
24	4.091			
25	3.819			

TABELA 3

Teores de nitratos em NaNO₃

Amostras	Valor mínimo mg/kg	Valor máximo mg/kg	Média mg/kg	Mediana mg/kg
Beterraba "in natura"	391	4.207	2.570	2.939
Corante líquido de beterraba	12.446	18.572	15.350	---
Beterraba em pó	13.632	31.990	20.730	20.561
Beterraba liofilizada	19.717	34.187	26.139	---

(--) = Número insuficiente de amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de beterraba *in natura*, corante líquido de beterraba, beterraba em pó e beterraba liofilizada, que foram analisadas, têm seus teores de nitrato em NaNO_3 demonstrados na tabela 2 e, na tabela 3 estão relacionados os valores mínimo, máximo, média e mediana respectivos.

Foram analisadas amostras de um mesmo lote, na seqüência do processamento de liofilização e os teores de nitrato encontrados foram os seguintes: beterraba *in natura*, 1.215 mg/kg; beterraba em pó, 31.990 mg/kg; beterraba liofilizada, 34.187 mg/kg expressos em NaNO_3 .

A comparação destes resultados indica o elevado teor de nitratos na beterraba *in natura*. Este teor, quando a beterraba é submetida a processamento para obtenção do corante, torna-se maior, numa média de 2.570 mg/kg na beterraba *in natura*, e 15.350 mg/kg no corante líquido de beterraba, 20.730

mg/kg na beterraba em pó e 26.139 mg/kg na beterraba liofilizada. Isto mostra, embora se disponha de poucos dados, que os diferentes processamentos não eliminam os nitratos contidos na amostra, mas os concentram.

As normas internacionais não estabeleceram um teor limite para os nitratos como impureza no corante de beterraba. Isto mostra a necessidade de revisão no processo de obtenção do corante (redução do nitrato existente) ou na norma, para estabelecer esse limite.

CONCLUSÃO

Recomenda-se, à luz destes resultados, que se estabeleça limite de nitratos para constar em monografia de corantes de beterraba, pois todas as amostras disponíveis no mercado apresentam teores elevados de nitratos, não condizentes com a proposta de 10 mg/kg já apresentada a nível internacional.

RIALA6/580

LARA, W.H.; TAKAHASHI, M.Y. & YABIKU, H.Y. — Nitrate levels in sugar-beet. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):109-113, 1984.

ABSTRACT: Levels of nitrates were determined in natural sugar-beet, powdered sugar-beet, lyophilized sugar-beet and beet dyes (beet red, liquid or powder). These levels varied from 391 to 34,181 mg/kg and they were higher in liquid and powder beet dyes while the highest levels were found in lyophilized products. These results suggest that the process for obtaining the beet dye must be revised and that there is a need for fixing a limit to nitrates in the Identity and Quality Specifications for beet red.

DESCRIPTORS: nitrates in sugar-beet, determination; Red beet dye, determination of nitrates; sugar-beet (*Beta vulgaris*), determination of nitrates.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL, leis, decretos, etc. — Resolução normativa n.º 08-79 da Câmara Técnica de Alimentos do Conselho Nacional de Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 1.º jun. 1979. Seção I, pt. I, p. 7843. Revoga a Resolução n.º 9-76 da CNNPA.
2. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. Rome, 1974. Specifications for the identity and purity of some food colours, flavour enhancers, thickening agents, and certain food additives. Genebra, WHO, 1976. p. 14. [WHO food additives series n.º 7]
3. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. Rome, 1978. Specifications for identity and purity of food colours, enzyme preparations and other food additives. Rome, FAO, 1978. p. 20. (FAO food and nutrition paper 7)
4. LARA, W.H. & TAKAHASHI, M.Y. — Níveis de nitratos em hortaliças. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42:53-7, 1982.
5. LEE, C.Y.; SHALLENBERGER, D.L.; DOWNING, G.S.; STOEWSAND, G.S. & PECK, N.M. — Nitrate and nitrite nitrogen in fresh, stored and processed table beets and spinach from different levels of field nitrogen fertilisation. *J. Sci. Food Agric.*, 22:90-2, 1982.
6. ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION — Normas de identidad y de pureza para los aditivos alimentarios. v. II: Colores alimentarios. Roma, FAO, 1963. p. 3.
7. WALKER, R. — Naturally occurring nitrate/nitrite in foods. *J. Sci. Food Agric.*, 26: 1735-42, 1975.

Recebido para publicação em 8 de fevereiro de 1984.

CONSIDERAÇÕES SOBRE 5.360 HEMOCULTURAS REALIZADAS NO INSTITUTO ADOLFO LUTZ, SÃO PAULO *

Maria Cristina de Cunto BRANDILEONE **
Carmo Elias Andrade MELLES **
Tânia Mara Ibelli VAZ **
Suzel Nogueira NEME **
Vera Simonsen Dias VIEIRA **
Gil Vital Álvares PESSOA **

RIALA6/581

BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A.; VAZ, T.M.I.; NEME, S.N.; VIEIRA, V.S.D. & PESSOA, G.V.A. — Considerações sobre 5.360 hemoculturas realizadas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):115-123, 1984.

RESUMO: Foram analisados os resultados de 5.360 culturas de sangue de pacientes provenientes do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", Hospital Infantil Cândido Fontoura, e do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas, no município de São Paulo, SP, durante o período de 1978 a 1982, em relação à incidência de infecções bacterianas mistas, faixas etárias, e à resistência das cepas isoladas aos antibióticos e sulfonamidas. As hemoculturas foram positivas em 19,70% dos casos, sendo que 18,06% correspondeu a infecções simples, enquanto que em 1,64% dos casos positivos foi encontrado mais de um germe como agente etiológico. Nas infecções simples evidenciou-se a predominância da *Salmonella typhimurium* em 24,40% dos casos, seguida pelo *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhi*, com 17,67 e 11,15%, respectivamente. Nas infecções mistas houve a predominância da *Klebsiella pneumoniae* em 20,91% dos casos, seguida pela *S. typhimurium* e *Escherichia coli* em 18,38 e 14,28% respectivamente, associadas entre si ou com outras bactérias. Foi digno de nota que em 7 casos foram isoladas cepas de *Shigella flexneri* pertencentes aos sorotipos 2 (4 casos), 3 (2 casos) e 4 (1 caso). Com relação à sensibilidade aos antibióticos testados, observou-se grande resistência da *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* a vários destes antibióticos. As cepas de *S. typhimurium* apresentaram 100% de sensibilidade ao cloranfenicol.

DESCRITORES: bactérias aeróbicas, bactérias anaeróbicas facultativas, isolamento de hemocultura; infecções bacterianas, prevalência, município de São Paulo, Brasil.

INTRODUÇÃO

As bacteremias por enterobactérias e outros bacilos Gram-negativos, já há alguns anos, têm suplantado aquelas causadas por cocos Gram-positivos, principalmente em pacientes hospitalizados^{4, 14, 19}. Esse aumento assumiu proporções espetaculares, sendo citado como principal fator desta variação a pressão seletiva dos antibióticos utilizados na terapêutica e profilaxia¹⁹.

O declínio das bacteremias por pneumococo e outros estreptococos, organismos sensíveis à maioria dos agentes antimicrobianos, deu espaço àquelas causadas por microrganismos como o *S. aureus*, enterobactérias, *Pseudomonas* etc., que desenvolveram diferentes graus de resistência a certos antibióticos ou que já eram naturalmente resistentes aos antimicrobianos¹⁹.

Com freqüência, os microrganismos entéricos e bacilos Gram-negativos aeróbios estri-

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

tos são responsabilizados pelas infecções adquiridas em hospitais e, conseqüentemente, pelas bacteremias hospitalares^{14, 18, 19}.

Tem sido referido que as infecções múltiplas, polimicrobianas, têm aumentado nos últimos anos, sendo que as associações mais freqüentes correspondem àquelas entre dois bacilos Gram-negativos^{11, 19}, posto que, sua ocorrência depende principalmente dos isolamentos e identificações dos microrganismos das culturas de sangue, porque os sinais e sintomas clínicos não auxiliam na distinção entre infecções múltiplas e monomicrobianas¹¹.

Neste trabalho, o objetivo foi o de avaliar a freqüência do isolamento de microrganismos nas infecções simples e mistas, distribuição etária, e o comportamento destes microrganismos, com relação aos antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

A Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, durante o período de 1.º de dezembro de 1978 a 30 de novembro de 1982, realizou 5.326 hemoculturas de pacientes com febre a esclarecer, provenientes do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", Hospital Infantil Cândido Fontoura, e do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas, todos no município de São Paulo, SP. O número de amostras de sangue para cultura colhido de cada paciente foi, em média, de 3 amostras por dia.

Em 1979, o meio de cultura que utilizamos para as hemoculturas foi o bifásico, de Castañeda; a partir de 1980, empregamos o caldo tripton de soja (TSB) ou caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), acrescidos de 10% de sacarose e 0,02% de sulfonato de polianetol sódico (SPS)^{1, 2, 8, 9}.

As amostras recebidas foram incubadas em estufa a 37°C e examinadas diariamente. No primeiro dia após a incubação de todos os caldos de cultura, independentemente do aspecto, era feita a subcultura em ágar-chocolate com base Muller-Hinton. Nos dias subseqüentes, dos frascos em que o caldo apresentou turvação, foram feitos esfregaços em lamina, que foram corados pelo método de Gram. Após a bacterioscopia, seguiu-se a semeadura em meios apropriados e posterior identificação do agente etiológico. Quando se tratava de cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos aeróbios estritos e bactérias do gênero *Haemophilus*, eram utilizadas somente provas bioquímicas para sua identificação^{7, 12, 13}; para os diplococos Gram-negativos e bacilos da família *Enterobacteriaceae*, além da identificação bioquímica foram realizadas provas sorológicas com anti-soros específicos para determinação de sorogrupos e sorotipos dos generos *Salmonella*,

Shigella e *E. coli*, e sorogrupos para *Neisseria meningitidis*.

Foram consideradas negativas aquelas culturas que, após 7 dias de incubação a 37°C², não desenvolveram qualquer crescimento bacteriano após a semeadura em ágar-chocolate com base Muller-Hinton, sob condições de umidade e sob tensão de 5-10% de gás carbônico, por 48 horas.

Os coágulos dos sangues recebidos para a reação sorológica de Widal eram semeados em meio seletivo de bile nutrose². Caso houvesse desenvolvimento bacteriano suspeito de *S. typhi*, procedia-se à identificação do microrganismo.

Para a realização dos antibiogramas, a metodologia foi a de BAUER *et alii*³ que utiliza discos de papel impregnados com antibióticos, nas concentrações a seguir discriminadas:

Penicilina	10 U.I.
Ampicilina	10 µg
Cefaloridina	30 µg
Estreptomina	10 µg
Canamicina	30 µg
Cloranfenicol	30 µg
Tetraciclina	30 µg
Gentamicina	10 µg
Ácido nalidíxico	30 µg
Colistina	10 µg
Amicacina	30 µg
Eritromicina	15 µg
Oxacilina	5 µg
Carbencilina	100 µg
Sulfadiazina	300 µg

Foram considerados casos de infecção simples ou monomicrobiana o isolamento de apenas um agente em pelo menos uma amostra; infecção mista ou polimicrobiana foi considerada quando se isolaram dois ou mais agentes na mesma amostra ou em amostras diferentes.

Cocos Gram-positivos coagulase negativa, bactérias esporuladas e diferóides, que normalmente são considerados como contaminantes¹⁹, não foram computados no presente estudo.

RESULTADOS

Dos 5.360 casos de hemoculturas revistos, 1.056, ou seja 19,70%, foram positivos, isto é, houve desenvolvimento de algum microrganismo. Do total destes casos positivos, em 968 foi isolado um único agente etiológico correspondendo a 18,06% dos casos, enquanto que em 88, ou seja, em 1,64% dos casos, a infecção foi causada por mais de uma bactéria.

Os casos de bacteriemias por infecção mista relacionados à faixa etária dos doentes estão representados diagramaticamente nas figuras 1 e 2, onde podemos observar que a predominância tanto de infecção simples como de mista ocorreu na faixa etária de 0 a 1 ano de idade, com 68,72% para o primeiro tipo de infecção e 76,13% para o segundo. A seguir, a faixa etária onde predominaram os dois tipos de infecção foi a de 1 a 10 anos, com um percentual de 14,19 e 7,98% para infecção simples e mista respectivamente.

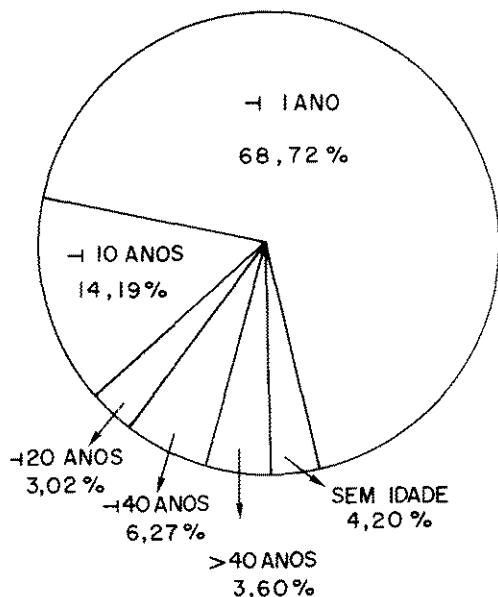


FIGURA 1 — Distribuição etária dos casos de bacteriemia por infecção simples.

Nas infecções simples obtivemos as percentagens de 60,86% de microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, de 29,78% de cocos Gram-positivos, de 4,72% de bacilos Gram-negativos aeróbios estritos, de 4,25% de *Haemophilus* e de 0,40% de diplococos Gram-negativos, cujos generos e espécies se encontram relacionados na tabela 1.

Nas infecções polimicrobianas foram isoladas 2 bactérias em 74 casos (84,10%), 3 bactérias em 12 casos (13,63%) e 4 bacté-

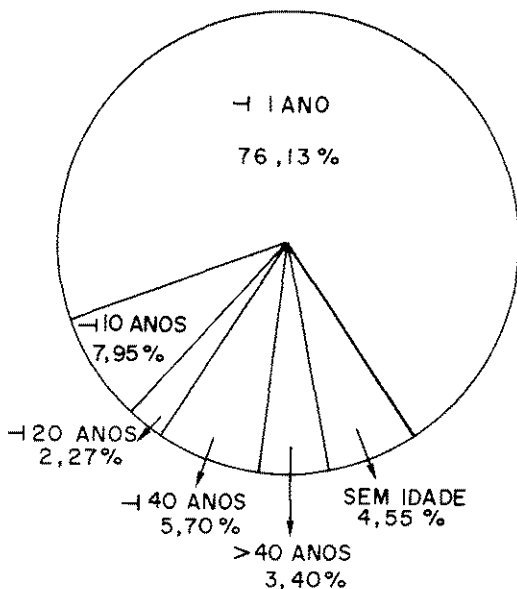


FIGURA 2 — Distribuição etária dos casos de bacteriemia por infecção mista.

rias em 2 casos (2,27%). As associações de agentes etiológicos observadas com maior frequência foram a de *S. typhimurium* e *K. pneumoniae*, seguidas de *K. pneumoniae* e *E. coli*. O número de vezes e os tipos de associações em que estes microrganismos aparecem estão demonstrados nas tabelas 2 e 3.

Os modelos de resistência aos antimicrobianos das bactérias isoladas em hemocultura encontram-se distribuídos na tabela 4.

DISCUSSÃO

A positividade das culturas de sangue em nosso estudo (19,70%) se mostrou superior à encontrada por DALTON & ALLISON⁴ e por JANSON¹⁰, que obtiveram respectivamente 15,60% e 5,5% de culturas positivas, cujas amostras procediam de hospitais; no levantamento realizado por BARTLETT², compreendendo 21 laboratórios clínicos de hospitais e universidades, foi obtida a porcentagem entre 6 a 15% para a maioria dos laboratórios questionados.

Nas infecções monomicrobianas (18,06%) obtivemos grande heterogeneidade de agentes etiológicos com marcante predomínio do gênero *Salmonella* (39,43%), sendo os sorotipos *S. typhimurium* (24,40%) e *S. typhi* (11,15%) os de maior ocorrência, dados que estão de acordo com PESSÓA *et alii*¹⁸, quando afirmam que o sorotipo *S. typhimurium* é predominante em nosso meio. Este sorotipo, que grassa de forma endêmica, é o grande responsável por infecções cruzadas, principalmente em berçários e enfermarias de pediatria. A alta frequência com que foi isolada a *S. typhi* demonstra claramente que a febre tifóide ainda é uma realidade entre nós.

O *Staphylococcus aureus* foi o segundo microrganismo mais frequentemente identificado nas infecções simples (17,67%), tendo sido observado aumento de 100% dos casos isolados em 1982, quando relacionado a 1979. Essa bactéria é a maior causadora de bacteriemias entre os cocos Gram-positivos encontrados.

BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A.; VAZ, T.M.I.; NEME, S.N.; VIEIRA, V.S.D. & PESSÓA, G.V.A. — Considerações sobre 5.360 hemoculturas realizadas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):115-123, 1984.

TABELA 1

Infecção simples — Número e percentual de casos e microrganismos isolados no quadriênio 1978-1982

Microrganismos	1979	1980	1981	1982	Total	%
<i>Streptococcus</i> sp.	13	23	15	19	70	7,25
<i>S. pneumoniae</i>	24	14	8	1	47	4,86
<i>S. aureus</i>	30	46	35	60	171	17,67
<i>N. meningitidis</i> B	1	1	—	—	2	0,20
<i>N. meningitidis</i> C	1	—	—	—	1	0,10
<i>N. meningitidis</i> Y	—	—	1	—	1	0,10
<i>Haemophilus</i> sp.	11	17	5	8	41	4,25
<i>S. typhimurium</i>	54	56	61	65	236	24,40
<i>S. typhi</i>	21	21	34	32	108	11,15
<i>S. agona</i>	2	4	5	3	14	1,45
<i>S. dublin</i>	2	—	—	2	4	0,41
<i>S. cholerae suis</i>	—	1	—	—	1	0,10
<i>S. infantis</i>	—	—	—	3	3	0,30
<i>S. panama</i>	—	—	1	—	1	0,10
<i>S. paratyphi</i> A	1	1	—	—	2	0,20
<i>S. enteritidis</i>	—	—	—	1	1	0,10
<i>Salmonella</i> sp.	2	—	—	4	6	0,61
<i>Salmonella</i> , 14, 12: — : —	2	—	2	—	4	0,41
<i>Salmonella</i> , 16, 7: — : —	—	—	2	—	2	0,20
<i>E. coli</i>	8	21	17	16	62	6,40
<i>K. pneumoniae</i>	8	15	15	26	64	6,61
<i>K. oxytoca</i>	1	—	—	1	2	0,20
<i>E. cloacae</i>	—	5	6	—	11	1,15
<i>S. marcescens</i>	3	17	8	12	40	4,15
<i>S. liquefaciens</i>	1	—	—	1	2	0,20
<i>P. morganii</i>	2	3	1	2	8	0,85
<i>P. mirabilis</i>	1	1	4	4	10	1,05
<i>P. vulgaris</i>	—	1	—	—	1	0,10
<i>Sh. flexneri</i> 2	1	2	1	—	4	0,41
<i>Sh. flexneri</i> 3	—	—	2	—	2	0,20
<i>Sh. flexneri</i> 4	1	—	—	—	1	0,10
<i>P. aeruginosa</i>	5	7	11	8	31	3,20
<i>P. maltophilia</i>	—	2	—	4	6	0,61
<i>P. putida</i>	—	—	1	—	1	0,10
<i>P. cepacia</i>	—	—	—	1	1	0,10
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	—	—	1	5	6	0,61
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	1	—	—	—	1	0,10
Total	196	258	236	278	968	100,00

BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A.; VAZ, T.M.I.; NEME, S.N.; VIEIRA, V.S.D. & PESSÓA, G.V.A. — Considerações sobre 5.360 hemoculturas realizadas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):115-123, 1984.

TABELA 2

Infecção mista — Associação de 2 espécies ou gêneros de bactérias em 74 casos

Microrganismos		N.º de casos
<i>S. typhimurium</i>	+ <i>K. pneumoniae</i>	11
<i>E. coli</i>	+ <i>K. pneumoniae</i>	7
<i>Streptococcus</i> sp.	+ <i>S. aureus</i>	6
<i>S. typhimurium</i>	+ <i>S. aureus</i>	5
<i>S. typhimurium</i>	+ <i>P. aeruginosa</i>	4
<i>S. typhimurium</i>	+ <i>S. marcescens</i>	3
<i>Escherichia coli</i>	+ <i>Proteus</i> sp.	3
<i>S. typhimurium</i>	+ <i>Escherichia coli</i>	2
<i>K. pneumoniae</i>	+ <i>S. marcescens</i>	2
<i>K. pneumoniae</i>	+ Bacilo Gram-negativo	2
<i>K. pneumoniae</i>	+ <i>Salmonella</i> sp.	2
<i>S. typhimurium</i>	+ <i>E. cloacae</i>	1
<i>S. typhimurium</i>	+ <i>P. maltophilia</i>	1
<i>S. typhimurium</i>	+ <i>Streptococcus</i> sp.	1
<i>S. typhimurium</i>	+ <i>N. meningitidis</i>	1
<i>E. coli</i>	+ <i>P. mirabilis</i>	1
<i>E. coli</i>	+ <i>P. morganii</i>	1
<i>E. coli</i>	+ <i>Haemophilus</i> sp.	1
<i>E. coli</i>	+ <i>Streptococcus</i> sp.	1
<i>E. coli</i>	+ <i>S. aureus</i>	1
<i>K. pneumoniae</i>	+ <i>E. cloacae</i>	1
<i>K. pneumoniae</i>	+ <i>P. morganii</i>	1
<i>K. pneumoniae</i>	+ <i>Citrobacter</i> sp.	1
<i>K. pneumoniae</i>	+ <i>S. aureus</i>	1
<i>P. aeruginosa</i>	+ <i>P. mirabilis</i>	1
<i>Streptococcus</i> sp.	+ <i>Haemophilus</i> sp.	2
<i>P. aeruginosa</i>	+ <i>S. marcescens</i>	2
<i>Streptococcus</i> sp.	+ <i>Enterobacter</i> sp.	1
<i>Salmonella</i> sp.	+ <i>P. aeruginosa</i>	1
<i>Salmonella</i> sp.	+ Bacilo Gram-negativo	1
<i>S. typhimurium</i>	+ <i>Haemophilus</i> sp.	1
<i>N. meningitidis</i>	+ <i>S. aureus</i>	1
<i>P. morganii</i>	+ Bacilo Gram-negativo	1
<i>K. pneumoniae</i>	+ <i>P. aeruginosa</i>	1
<i>P. aeruginosa</i>	+ <i>S. pneumoniae</i>	1
<i>P. aeruginosa</i>	+ <i>E. coli</i>	1

(+) = Associação.

TABELA 3

Infecção mista — Associação de 3 ou 4 espécies ou gêneros de bactérias em 14 casos

Microorganismos				N.º de casos
<i>E. coli</i>	+	<i>K. pneumoniae</i>	+ <i>S. aureus</i>	2
<i>E. coli</i>	+	<i>K. pneumoniae</i>	+ <i>P. aeruginosa</i>	1
<i>E. coli</i>	+	<i>S. typhimurium</i>	+ <i>P.morganii</i>	1
<i>E. coli</i>	+	<i>E. cloacae</i>	+ <i>P. putida</i>	1
<i>S. typhimurium</i>	+	<i>K. pneumoniae</i>	+ <i>Citrobacter</i> sp.	1
<i>E. coli</i>	+	<i>K. pneumoniae</i>	+ <i>Streptococcus</i> sp.	1
<i>P. aeruginosa</i>	+	<i>K. pneumoniae</i>	+ <i>E. cloacae</i>	1
<i>E. coli</i>	+	<i>K. pneumoniae</i>	+ <i>Salmonella</i> 14, 12: — : —	1
<i>K. pneumoniae</i>	+	<i>S. typhimurium</i>	+ <i>P. aeruginosa</i>	1
<i>K. pneumoniae</i>	+	<i>S. marcescens</i>	+ <i>K. oxytoca</i>	1
<i>K. pneumoniae</i>	+	<i>P.morganii</i>	+ <i>P. maltophilia</i>	1
<i>K. pneumoniae</i>	+	<i>E. coli</i>	+ <i>P. mirabilis</i> + <i>S. aureus</i>	1
<i>E. coli</i>	+	<i>P. mirabilis</i>	+ <i>P. maltophilia</i> + <i>E. cloacae</i>	1

Em relação aos diplococos Gram-negativos, a única espécie isolada foi a *Neisseria meningitidis*, sendo que a dificuldade de seu isolamento de cultura de sangue é documentada por vários autores^{6, 16}.

Os subcultivos realizados em 16-18 horas após incubação foram de grande interesse quando da suspeita clínica de bacteriemia, principalmente quando os agentes etiológicos isolados foram *Haemophilus* sp e *S. pneumoniae* pois, neste último caso, a pronta recuperação da bactéria facilitou sua identificação, pelo fato ser o germe extremamente sensível às variações de pH do meio de cultura, perdendo facilmente sua característica de Gram-positividade, sua cápsula e viabilidade.

A frequência de isolamento de *Streptococcus* sp. (7,25%), *Klebsiella pneumoniae* (6,61%) e *Escherichia coli* (6,40%) demonstrou serem estas bactérias, importantes agentes primários de infecções sanguíneas. Bastante interessante é a alta incidência de *Serratia marcescens* (4,15%) em relação à *Enterobacter cloacae* (1,15%), fato não encontrado por SOMENVIRTH¹⁹, em seu estudo. *K. oxytoca* e *S. liquefaciens* foram isolados na frequência de 0,2% das infecções simples.

É digno de nota o isolamento em 7 casos de *Shigella flexneri* pertencentes aos soro-

tipos 2 (4 casos), 3 (2 casos) e 4 (1 caso). A disseminação de *Shigella* pela corrente circulatória é considerada excepcional, geralmente observada em países tropicais, sendo o sorogrupo *S. flexneri* o mais freqüentemente isolado^{5, 16}.

Entre os bacilos Gram-negativos aeróbios estritos foram isoladas várias espécies de *Pseudomonas*, sendo que a *P. aeruginosa* foi a de maior importância (3,20%); a *Acinetobacter calcoaceticus* foi isolada em 6 casos, enquanto a bactéria *Flavobacterium meningosepticum* o foi em apenas 1 caso de infecção simples.

O aumento da incidência de infecções poli-microbianas é documentado por vários autores^{4, 11, 19}, mas a percentagem desse tipo de infecção em nosso estudo foi de 1,64%, inferior aos dados encontrados na bibliografia pesquisada.

Nas diferentes associações de 2 microrganismos (84,10%), 3 microrganismos (13,63%), e 4 microrganismos (2,2%), os tipos mais freqüentes de combinação foram entre bacilos Gram-negativos.

Houve predominância, nas infecções polimicrobianas, da *K. pneumoniae* (20,91%), seguida pela *S. typhimurium* (18,36%) e *Escherichia coli* (14,28%), associados entre si ou com outras bactérias.

TABELA 4

Perfil de resistência e sensibilidade dos microrganismos isolados de hemoculturas frente a diferentes agentes antibacterianos

Microrganismos	Número de cepas resistentes aos antibióticos e quimioterápicos															N.º de cepas sensíveis a todos os antibióticos estudados	Total de cepas estudadas
	Ampicilina	Ácido nalidíxico	Cefaloridina	Estreptomicina	Canamicina	Cloranfenicol	Tetraciclina	Gentamicina	Amicacina	Colistina	Penicilina	Eritromicina	Oxacilina	Carbenicilina	Sulfonamidas		
<i>S. typhimurium</i>	258	256	251	258	257	251	239	246	96	4	—	—	—	—	—	1*	260
<i>S. agona</i>	14	0	14	12	13	0	14	12	3	0	—	—	—	—	—	0	14
<i>S. infantis</i>	5	2	5	4	5	5	5	5	0	0	—	—	—	—	—	0	5
<i>Salmonella</i> sp.	6	6	6	12	6	6	6	6	6	0	—	—	—	—	—	5	19
<i>Escherichia coli</i>	54	4	18	48	33	35	38	17	11	4	—	—	—	—	—	14	73
<i>K. pneumoniae</i>	93	8	66	72	81	81	71	79	57	3	—	—	—	—	—	0	95
<i>E. cloacae</i>	16	1	16	15	10	11	13	10	7	3	—	—	—	—	—	2	17
<i>Serratia</i> sp.	38	1	38	17	15	16	35	12	8	29	—	—	—	—	—	0	42
<i>Shigella</i> sp.	2	0	0	7	2	4	4	0	0	0	—	—	—	—	—	0	7
<i>Proteus</i> sp.	23	2	18	23	16	16	27	14	10	22	—	—	—	—	—	0	30
<i>S. aureus</i>	136	—	51	89	86	69	83	76	—	—	136	80	65	—	—	2	139
<i>Streptococcus</i> sp.	29	—	28	67	65	21	46	54	—	—	29	32	—	—	—	3	71
<i>S. pneumoniae</i>	1	—	0	—	—	0	13	36	—	—	1	1	—	—	—	3	39
<i>N. meningitidis</i>	1	—	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	6	0	6
<i>Haemophilus</i> sp.	35	—	34	31	32	5	15	29	—	5	35	39	—	—	—	1	40
<i>Pseudomonas</i> sp.	51	41	51	43	48	45	50	15	6	6	—	—	8	—	—	0	51
<i>A. calcoaceticus</i>	6	1	6	6	5	5	4	3	3	1	—	—	0	—	—	0	6
<i>F. meningosepticum</i>	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	—	—	—	—	—	0	1

(*) *Salmonella typhimurium* 0:5+.

(—) = antibióticos não-testados.

BRANDILEONE, M.C.C.; MELES, C.E.A.; VAZ, T.M.I.; NEME, S.N.; VIEIRA, V.S.D. & PESSOA, G.V.A. — Considerações sobre 5.360 hemoculturas realizadas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2): 115-129, 1984.

Com relação à distribuição etária, tanto nas infecções simples (com exceção dos casos de febre tifóide) como nas infecções mistas, houve predominância na faixa entre 0 e 1 ano de idade, para os diferentes agentes microbianos. *Salmonella typhi* foi isolada principalmente na faixa etária entre 20-40 anos.

Quanto à resistência aos antibióticos, devemos evidenciar o padrão resistente das cepas de *S. typhimurium* aos antibióticos testados, que é o mesmo encontrado por PESSÓA *et alii*¹⁶, em 1976.

A *S. agona* apresentou-se resistente a 6 marcas de antimicrobianos, enquanto *S. infantis*, apresentou resistência a 7 daqueles testados. É notório também a reconhecida resistência das diferentes espécies de *Pseudomonas* e das cepas de *Acinetobacter cal-*

coacteticus. As cepas de *S. aureus* apresentaram praticamente 100% de resistência à penicilina, e as cepas de *S. typhi* foram totalmente sensíveis ao cloranfenicol.

Em nosso estudo foi verificada predominância das enterobactérias como causadoras de bacteremias, em especial a *S. typhimurium* seguida da *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. marcescens*; esses agentes etiológicos demonstraram resistência a vários antimicrobianos e predominaram na faixa etária de 0 a 1 ano, significando possivelmente infecções nosocomiais.

AGRADECIMENTOS

A Kinue Irino, pela colaboração prestada na elaboração deste trabalho.

RIALA6/581

BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A.; VAZ, T.M.I.; NEME, S.N.; VIEIRA, V.S.D. & PESSÓA, G.V.A. — Considerations on 5,360 blood cultures performed in Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2): 115-123, 1984.

ABSTRACT: Positivity, frequency of mixed infections, age group and anti-microbe resistance were examined in the results of 5,360 bacterial cultures of the blood of patients from an infectious disease hospital and two pediatric hospitals from São Paulo municipality during the period of 1979 to 1982. Blood cultures were positive in 19.70% of the specimens, of which, 18.06% showed a single bacteria while 1.64% showed more than one. In the single infection cases, *Salmonella typhimurium* predominated with 24.40% of the positive specimens while *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi* were found in 17.67% and 11.15%, respectively. In the mixed-infection specimens, *Klebsiella pneumoniae* was found in 20.91% of the specimens, *S. typhimurium* and *Escherichia coli* in 18.38% and 14.28%, respectively, these bacteria being associated among them or with other bacteria. *Shigella flexneri* serotype 2 was found in two specimens, serotype 3 in two specimens, and serotype 4 in one blood. Marked resistance to antimicrobial substances was shown by *S. typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* and *K. pneumoniae*. All isolates of *S. typhi* were sensitive to chloramphenicol.

DESCRIPTORS: bacteria, aerobic, facultative anaerobic, isolation from blood culture; bacterial infections, prevalence, São Paulo municipality, Brazil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BABU, J.P.; SCHELL, R.F. & LE FROCK, J.L. — Evaluation of twenty-three blood culture media. *J. clin. Microbiol.*, 8:288-92, 1978.
2. BARTLETT, R.C. — Métodos actuales en cultivos de sangre. In: SONNENWIRTH, A.C. — *Bacteriemia: aspectos clínicos y de laboratorio*. Trad. del inglés por Irma Lorenzo. Buenos Aires, Panamericana, 1975. p. 29-52.
3. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. clin. Path.*, 45: 493-6, 1966.
4. DALTON, H.P. & ALLISON, M.J. — Etiology of bacteremia. *Appl. Microbiol.*, 15: 808-14, 1967.
5. DUNCAN, B.; FULGINITI, V.A.; SIEBER, O.F., Jr. & RYAN, K.J. — *Shigella* sepsis. *Amer. J. Dis. Child.*, 135:151-4, 1981.

6. ENG., J. & IVELAND, H. — Inhibitory effect in vitro of sodium polyanethol sulfonate on the growth of *Neisseria meningitidis*. *J. clin. Microbiol.*, 1:444-7, 1975.
7. FACKLAN, R.R. — Streptococci and aerococci. In: LENNETTE, E.H. *et alii*, ed. — *Manual of clinical microbiology*. 3rd ed. Washington, D.C., Amer. Soc. Microbiology, 1980. p. 88-110.
8. PINEGOLD, S.M. — Detección precoz de la bacteriemia. In: SONNENWIRTH, A.C. — *Bacteriemia: aspectos clínicos y de laboratorio*. Trad. del inglés por Irma Lorenzo. Buenos Aires, Panamericana, 1975. p. 53-8.
9. ISENBERG, H.D.; WASHINGTON II, J.A.; BALOWS, A. & SONNENWIRTH, A.C. — Collection, handling and processing of specimens. In: LENNETTE, E.H. *et alii*, ed. — *Manual of clinical microbiology*. 3rd ed. Washington, D.C., Amer. Soc. Microbiology, 1980. p. 52-6.
10. JANSSON, E. — A 10-year study of bacteremia. *Scand. J. infect. Dis.*, 3:151-5, 1971.
11. KIANI, D.; QUINN, E.L.; BURCK, K.H.; MADHAVAN, T.; SARAVOLATZ, L.D. & NEBLETT, T.R. — The increasing importance of polymicrobial bacteremia. *J. amer. med. Assoc.*, 242:1044-7, 1979.
12. KILIAN, M. — *Haemophilus*. In: LENNETTE, E.H. *et alii*, ed. — *Manual of clinical microbiology*. 3rd ed. Washington, D.C., Amer. Soc. Microbiology, 1980. p. 330-6.
13. KLOOS, W.E. & SMITH, P.B. — Staphylococci. In: LENNETTE, E.H. *et alii*, ed. — *Manual of clinical microbiology*. 3rd ed. Washington, D.C., Amer. Soc. Microbiology, 1980. p. 83-7.
14. McCABE, W.R. & JACKSON, G.G. — Gram-negative bacteremia. *Arch. intern. Med.*, 110:847-55, 1962.
15. MOL, P.; BRASSEUR, D.; SCHATTEMAN, E. & SHALDA, K. — Shigella and Shigellaemia. *Scand. J. infect. Dis.*, 13:75-7, 1981.
16. PAI, C.H. & SORGER, S. — Enhancement of recovery of *Neisseria meningitidis* by gelatin in blood culture media. *J. clin. Microbiol.*, 14:20-3, 1981.
17. PESSÔA, G.V.A.; IRINO, K.; CALZADA, C.T.; MELLES, C.E.A. & KANO, E. — Ocorrência de bactérias enteropatógenicas em São Paulo no septênio 1980-76. I — Sorotipos de *Salmonella* isolados e identificados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38:87-105, 1978.
18. PESSÔA, G.V.A.; SUGHIMORI, R.T.; IRINO, K.; RASKIN, M. & CALZADA, C.T. — Isolamento de enterobactérias patogênicas em berçários do município de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40:107-27, 1980.
19. SONNERWIRTH, A.C. — Bacteriemia, alcance del problema. In: SONNERWIRTH, A.C. *et alii* — *Bacteriemia: aspectos clínicos y de laboratorio*. Trad. del inglés por Irma Lorenzo. Buenos Aires, Panamericana, 1975. p. 15-28.

Recebido para publicação em 17 de fevereiro de 1984.

LISTERIOSE HUMANA. PREVALÊNCIA DOS SOROTIPOS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLADOS NO BRASIL *

Ernesto HOFER **

Gil Vital Álvares PESSÓA ***

Carmo Elias Andrade MELLES ***

RIALAG/582

HOFER, E.; PESSÓA, G.V.A. & MELLES, C.E.A. — Listeriose humana. Prevalência dos sorotipos de *Listeria monocytogenes* isolados no Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):125-131, 1984.

RESUMO: Foram caracterizadas sorologicamente 71 amostras de *Listeria monocytogenes*, isoladas de processos patológicos e de portadores humanos, no período de 1969 a 1983. As amostras estudadas originaram-se de diferentes regiões do país, representadas pelos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Pernambuco e Bahia.

A análise sorológica permitiu o reconhecimento de sete sorotipos distintos, destacando-se no cômputo geral a predominância de L 4b (50,70%) sobre L 1/2a (29,57%). Em plano secundário, foram detectados os sorotipos L 4a (7,04%); L 4ab (5,63%); L 1/2b (1,40%); L 1/2c (1,40%) e L 4g (1,40%).

DESCRITORES: listeriose humana, Brasil; *Listeria monocytogenes*, sorotipos, prevalência no Brasil.

INTRODUÇÃO

A listeriose é uma doença que acomete o homem e inúmeras espécies de animais, e tem como uma das principais características a sua ocorrência cosmopolita. Apesar de o reconhecimento do seu agente etiológico, como causa de enfermidade humana, já ter ultrapassado cinquenta anos (NYFELDT²³, 1929), somente nas duas últimas décadas foi incitado maior número de pesquisas clínicas e laboratoriais, cujos resultados demonstraram não se tratar de uma entidade nosológica tão rara como se propalava².

Por outro lado, não há dúvida sobre a presença deste agente bacteriano no elenco das doenças humanas em nosso meio, retratada nas várias investigações, como as encetadas por CARDOSO⁴ PACHECO et alii^{24, 25, 26, 27, 28}, MADRUGA^{18, 19}, LIMA & SOUZA¹⁷, HOFER et alii^{10, 11, 12}, SUASSUNA et

alii³¹, MENEZES²¹, KRAHE¹⁵, TAKEUCHI et alii³², MASTROLORENZO et alii²⁰, ESPER et alii⁶ e SARAIVA et alii²⁹, excluindo aquelas de natureza sorodiagnóstica.

A exigüidade de informações sobre a incidência de sorotipos de *Listeria monocytogenes* envolvidos nas diferentes formas de apresentação da listeriose humana ocorridas em algumas regiões do Brasil, aliada à possibilidade de ofertar maior número de variáveis para as análises epidemiológicas que vierem a ser executadas no futuro, se constituíram nos objetivos básicos da presente investigação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas bioquímica e sorologicamente 71 amostras de *Listeria monocytogenes*, isoladas de processos infecciosos e de portadores humanos, colecionadas durante o

* Realizado no Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, e na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Oswaldo Cruz.

*** Do Instituto Adolfo Lutz.

período de 1969 a 1983. A distribuição das estirpes segundo a origem geográfica e as fontes que propiciaram o isolamento, figura na tabela 1. Salienta-se que as amostras do Estado de São Paulo provieram do Instituto Adolfo Lutz, onde foram isoladas e identificadas em material de doentes internados nos hospitais "Emílio Ribas" e do Servidor Público, e no Instituto da Criança; as do Rio de Janeiro são as utilizadas em trabalhos anteriores realizados por HOFER et alii^{10, 11, 12}, e as provenientes do Instituto Fernandes Figueira; as amostras de Pernambuco e da Bahia foram as recebidas de pesquisadores e instituições locais para a devida confirmação.

Para a caracterização bioquímica, adotou-se a orientação de SEELIGER³⁰, e, na determinação dos sorotipos, empregou-se a técnica preconizada por DONKER-VOET⁵.

Quanto à avaliação da patogenicidade, recorreu-se ao processo descrito por ANTON¹, cuja leitura se baseou na evolução ou não do quadro de ceratoconjuntivite em cobaia. A ação hemolítica das amostras foi verificada em ágar-triptose (DIFCO) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro e de coelho, respectivamente.

RESULTADOS

A análise do comportamento bioquímico das amostras revelou acentuada homogeneidade das reações, com discretas variações no que tange à ramnose, sacarose, xilose, sorbitol, e na pesquisa de Vermelho de Metila. Tais alterações foram observadas, particularmente, nas estirpes isoladas de fezes (não determinadas sorologicamente) e no sorotipo L 4g, proveniente de secreção vaginal.

A hemólise total em ágar sangue de coelho foi notada em 66 amostras (92,9%), em contraposição às 59 culturas (83,0%) que evidenciaram ação hemolítica em ágar san-

gue de carneiro. As formas anemolíticas foram detectadas essencialmente nas amostras (5 ou 7,04%) isoladas de fezes e secreção vaginal (sorotipos L 4b, L 4g e não determinadas). Este aspecto caracteriza a maior sensibilidade das hemátias de coelho à ação da hemolisina de listérias.

Quanto à prova de Anton salienta-se que apenas 5 amostras (7,04%) que não demonstraram ceratoconjuntivite, representadas pelos sorotipos L 4b, L 4g e não determinadas, eram oriundas de fezes e secreção vaginal de portadores da cidade do Rio de Janeiro.

Na identificação sorológica, foram detectados sete sorotipos diferentes; entretanto, em duas amostras, a caracterização antigênica somente permitiu o reconhecimento da espécie.

Dentre os sorotipos determinados, acentua-se a predominância do sorotipo L 4b, constituído de 36 amostras (50,70%) e, em segundo plano, o sorotipo L 1/2a com 21 culturas (29,57%), de acordo com os dados assinalados na tabela 1.

Na distribuição dos sorotipos, segundo os espécimes que ofertaram os isolamentos destaca-se a ocorrência dos tipos L 4b e L 1/2a nos líquidos cefalorraquidianos e em fezes. Nas amostras provenientes de secreção vaginal, acentua-se a relevância do sorotipo L 1/2a (tabela 2).

Considerando que o maior contingente de amostras originou-se de processos com localização no sistema nervoso central, e tendo em vista a obtenção das idades dos pacientes, foi possível estabelecer a distribuição dos sorotipos de acordo com os grupos etários envolvidos (tabela 3).

Finalmente, na tabela 4, assinalam-se os resultados ofertados sobre a prevalência e/ou incidência dos sorotipos em relação à origem geográfica das amostras.

TABELA 1

Distribuição das amostras de L. monocytogenes de acordo com a fonte de isolamento e procedência

Material clínico	Procedência das amostras				Total
	S. Paulo	Rio de Janeiro	Pernambuco	Bahia	
L.C.R.*	40	—	2	—	42
Fezes	—	16	—	—	16
Secreção vaginal	—	5	1	—	6
Placenta	—	—	—	2	2
Sangue	1	—	1	—	2
Desconhecido	2	1	—	—	3
TOTAL	43	22	4	2	71

* Líquido cefalorraquidiano.

TABELA 2

Freqüência dos sorotipos de L. monocytogenes segundo as fontes de isolamento

Origem das amostras	Sorotipos								Total (percentagem)
	L 1/2a	L 1/2b	L 1/2c	L 4a	L 4b	L 4ab	L 4 g	N.D.**	
L.C.R.*	11	—	1	1	27	2	—	—	42 (59,15)
Fezes	4	1	—	1	8	—	—	2	16 (22,53)
Secreção vaginal	2	—	—	1	1	1	1	—	6 (8,45)
Placenta	2	—	—	—	—	—	—	—	2 (2,81)
Sangue	—	—	—	1	—	1	—	—	2 (2,81)
Desconhecida	2	—	—	1	—	—	—	—	3 (4,22)
Total (percentagem)	21 (29,57)	1 (1,40)	1 (1,40)	5 (7,04)	36 (50,70)	4 (5,63)	1 (1,40)	2 (2,81)	71 (99,97)

* Líquido cefalorraquidiano.

** Não-determinado.

TABELA 3

Distribuição dos sorotipos de L. monocytogenes isolados de líquido cefalorraquidiano de acordo com as faixas etárias dos pacientes

Faixa etária	Sorotipos					Total (percentagem)
	L 1/2a	L 1/2c	L 4a	L 4b	L 4ab	
0-1 mês	6	—	—	4	1	11 (26,19)
2-11 meses	1	—	—	1	—	2 (4,76)
1-9 anos	1	—	—	6	1	8 (19,04)
10-19 anos	2	—	—	5	—	7 (16,66)
20-29 anos	1	—	1	2	—	4 (9,52)
30-39 anos	—	—	—	3	—	3 (7,14)
40-49 anos	—	—	—	3	—	3 (7,14)
50-59 anos	—	—	—	1	—	1 (2,38)
70-79 anos	—	—	—	1	—	1 (2,38)
Desconhecida	—	1	—	1	—	2 (4,76)
Total (percentagem)	11 (26,19)	1 (2,38)	1 (2,38)	27 (64,28)	2 (4,76)	42 (99,97)

TABELA 4

Procedência dos sorotipos de L. monocytogenes em relação às regiões

Região	Sorotipos								Total
	L 1/2a	L 1/2b	L 1/2c	L 4a	L 4b	L 4ab	L 4g	N.D.	
S. Paulo	11	—	1	2	27	2	—	—	43
Rio de Janeiro	6	1	—	3	9	—	1	2	22
Pernambuco	2	—	—	—	—	2	—	—	4
Bahia	2	—	—	—	—	—	—	—	2
Total	21	1	1	5	36	4	1	2	71

DISCUSSÃO

O acontecimento da listeriose humana no mundo tem revelado uma acentuada ocorrência em crianças recém-nadas, ou no transcurso da gravidez, circunstanciado principalmente pela contaminação fetal intra e extra-uterina. As manifestações clínicas, comumente associadas a tais patogenias, são configuradas pela meningite, septicemia, formas tifóidicas e pulmonares, granulomatose séptica e aborto. Outras formas de apresentação da doença, via de regra, acometem indivíduos em que é possível aduzir como causa primária a deficiência de resistência orgânica, como nos problemas advindos da cirrose

de Laennec, doença de Hodgkin, enfermidades cardíacas, arteriosclerose, hepatite colangiostica, neoplasias, doenças do colágeno, diabetes melito, lúpus eritematoso, leucemias agudas e crônicas, mielomas múltiplos e transplante de órgãos^{2, 3, 9}. A doença apresenta ainda aspectos esdrúxulos sob o prisma clínico-epidemiológico que, na maioria das vezes, dificultam a detecção do agente, alertando desta maneira para a possível existência de uma infecção tolerada ou inaparente^{2, 3, 9, 12, 14}.

Paradoxalmente, a *L. monocytogenes*, apesar de sua ampla disseminação na natureza, oferta uma casuística no homem e animais,

que poderá ser classificada como esporádica. Entretanto, as inúmeras evidências acumuladas, através das investigações realizadas, demonstraram de modo insofismável que muitas espécies animais, inclusive o homem, carregam a bactéria no intestino, sem exteriorizar sinais clínicos^{2, 12, 14}.

Além dos aspectos suscitados, convém salientar que a exigüidade de casos comprovados bacteriologicamente de listeriose decorre, segundo GRADWOHL⁸, de certos conceitos errôneos sobre o microrganismo. Dentre essas premissas mais arraigadas, destaca-se a sua caracterização habitual, como contaminante, recebendo a identificação genérica de "difteróide", mesmo quando isolada de espécimens clínicos de indivíduos portadores de algumas das formas assinaladas.

O problema "Listeriose" apresenta, portanto, uma notável complexidade sob todos os ângulos, cujas dificuldades se refletem, particularmente, no âmbito da epidemiologia. Talvez o maior óbice para as análises epidemiológicas resida no conhecimento da incidência dos sorotipos nas diferentes fontes e áreas de infecção envolvidas. É claro que esta situação decorre, principalmente, do número limitado de laboratórios interessados no assunto, possuidores das condições para executar a caracterização sorológica.

Em nosso meio, com base na averiguação bibliográfica até 1969, observa-se que, em dez trabalhos, a metade notificou a caracterização de sorotipos nas seis amostras isoladas, tendo predominância do tipo L 1^{10, 27, 31}, seqüenciado pelos sorotipos L 4^{10, 26}, e L 3¹⁸. Já a partir de 1970, nas sete pesquisas consultadas, em que foram isoladas 32 listérias, verifica-se a acentuada ocorrência do sorotipo L 4b, representado por 19 amostras, secundado pelos sorotipos L 1/2a com 9 culturas; L 4a foi detectado em 3 amostras; L 2 em uma, e duas estirpes foram identificadas apenas quanto ao gênero.

Este confronto das duas fases evidencia, primordialmente, a evolução dos conhecimentos auferidos sobre as técnicas de isolamento e identificação de *Listeria*, propiciando, por conseguinte, um número de amostras significativamente superior e possibilitando a alguns laboratórios a implementação de processos de caracterização antigênica dos isolados.

A análise dos resultados obtidos confirma a destacada ocorrência de *Listeria* nos processos patológicos primários do sistema nervoso central, demonstrando, inclusive, uma faceta um tanto inusitada, em relação às outras partes do mundo, isto é, do comprometimento de faixas etárias mais produtivas (tabela 3). Assinala-se o fenômeno da maior incidência do sorotipo L 1/2a na faixa etária de 0 a 1 mês de idade, enquanto nas demais o sorotipo L 4b predomina. Curiosa-

mente, nos cultivos de secreções vaginais e placenta (tabela 2) prevalece também o sorotipo L 1/2a, o que talvez poderia explicar as contaminações nas fases de concepção e do parto, tendo em vista que a colonização deste sorotipo, nas diferentes porções do trato genital, foi mais evidente do que a do tipo sorológico L 4b. Coincidentemente, a totalidade das amostras do sorotipo L 1/2a foi capaz de produzir a ceratoconjuntivite e a hemólise total, parâmetros normalmente adotados para avaliação do grau de patogenicidade de *Listeria*.

Outro aspecto que convém enfatizar em relação às amostras isoladas de L.C.R., em pacientes da faixa etária de 0 — 1 mês de idade, refere-se ao critério de classificação clínica das formas de listeriose neonatal, apresentado por MONNET²² e LARSSON¹⁶. Assim menciona-se que apenas duas amostras (sorotipos L 1/2a e L 4ab), oriundas de Pernambuco, coadunavam-se com a "forma precoce", que se define pelo comprometimento do recém-nascido até o 3.º dia de vida, sendo o agente transmitido por via hematogênica transplacentária. Ainda sob esse prisma, salienta-se a detecção de uma amostra (sorotipo L 1/2a) de S. Paulo, que poderia ser enquadrada na "forma intermediária" que, geralmente, ocorre no período de 3 a 5 dias após o nascimento.

Todas as demais estirpes, em número de oito, de acordo com tal critério clínico, estariam relacionadas à "forma tardia", cujos sinais surgem após 5-6 dias de vida, exteriorizando-se pelo quadro de meningite e tendo, como mecanismos de transmissão, as contaminações sofridas pelo indivíduo durante o parto, ou através de infecção hospitalar.

Quanto à freqüência dos vários sorotipos em nosso meio, revelando a predominância do tipo sorológico L 4b, observa-se que esta faceta se identifica plenamente com aquelas particularizadas mais recentemente no continente europeu (27, 14, 22). Em contraposição, nos Estados Unidos da América proliferam de modo bem mais acentuado os sorotipos L 1/2b e L 1/2a³, embora em certas regiões, se registre um equilíbrio na freqüência dos sorotipos L 1 e L 4b¹³.

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Diva Montenegro, Marcelo Magalhães, Nilma Cintra Leal, da Universidade Federal de Pernambuco e Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, PE, e aos Drs. Litório A. E. Mastrolorenzo e Moacyr D. Moura Costa, da Universidade Federal da Bahia, pelo fornecimento das amostras e aos técnicos Rosemary Ribeiro, Deise Paranhos e Maria Severina Pinheiro pela colaboração prestada.

HOFER, E.; PESSÓA, G.V.A. & MELLES, C.E.A. — Human listeriosis. Prevalence of the serotypes of *Listeria monocytogenes* in Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):125-131, 1984.

ABSTRACT: During the period 1969 to 1983, 71 strains of *Listeria monocytogenes* were isolated from patients and carriers from the states of São Paulo, Rio de Janeiro, Pernambuco and Bahia. Serologic analysis disclosed seven distinct serotypes. The frequencies were 50.70%, for serotype L 4b; 29.57%, for L 1/2a; 7.04%, for L 4a; 5.63%, for L 4ab; 1.40%, for L 1/2b; 1.40%, for L 1/2c; and 1.40%, for L 4g.

DESCRIPTORS: listeriosis human, Brazil; *Listeria monocytogenes*, serotypes, prevalence in Brazil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTON, W. — Kritisch-experimenteller Beitrag zur Biologie des *Bakterium monocytogenes*. Mit besonderer Berücksichtigung seiner Beziehung zur infektiösen Mononukleose des Menschen. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 131:89-103, 1934.
2. BØJSEN-MÖLLER, J. — Human Listeriosis: diagnostic, epidemiological and clinical studies. *Acta pathol. microbiol. scand.* (Section B. Suppl.), 229:1-157, 1972.
3. BUSCH, L.A. — Human Listeriosis in the United States, 1967-1969, *J. infect. Dis.*, 123(3):328-332, 1971.
4. CARDOSO, R.A.A. — A listeriose como doença humana. *Bol. Inst. Pueric. Univ. Brasil*, 12:157-65, 1955.
5. DONKER-VOET, J. — A serological study of some strains of *Listeria monocytogenes* isolated in Michigan. *Am. J. vet. Res.*, 20:176-179, 1959.
6. ESPER, M.R.N.R.; PESSÓA, 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*, 38:37-41, 1978.
7. GOMEZ-MAMPASO, E.; OQUINENA, L.M.; MOCHALES, F.B.; VILLALBA, A.G. & PEREZ, M.C.M. — Tee value of vaginal and cervical uterine smears as a diagnostic means of maternal-fetal listeriosis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LISTERIOSIS, 7th, Varna, 1977. Problems of listeriosis. *Proceedings*, edited by I. Ivanov, Varna, 1979. p. 155-69.
8. GRADWOHL, R.B.H. — *Clinical laboratory methods and diagnosis: a textbook on laboratory procedures and their interpretation*. 7th ed. Edited by Sam Fraenkel, S. Reitman & A.C. Sonnemwirth. St. Louis, Mosby, 1970.
9. GRAY, M.L. & KILLINGER, A.H. — *Listeria monocytogenes* and listeria infections. *Bacteriol. Rev.*, 30:309-371, 1966.
10. HOFER, E. & MORAES, D.M.S. — Isolamento de *Listeria monocytogenes* em secreção vaginal. *Anais Microbiol.* (Rio de J.), 16:153, 1969.
11. HOFER, E. — Pesquisa sobre a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em fezes humanas. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 8:109-16, 1974.
12. 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. 114 p. [Tese livre-doc. — Instituto de Veterinária da Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro]
13. HOOD, M. Listeriosis: Louisiana, 1954-1974. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LISTERIOSIS, 6th, Leicester, 1974. Problems of listeriosis. *Proceedings*, edited by M. Woodbine. Leicester, Leicester Univ. pres., 1975. p. 234-7.
14. KAMPELMACHER, E.H. & JANSEN, L.M.V. — Listeriosis in humans and animals in the Netherlands. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LISTERIOSIS, 7th, Varna, 1977. Problems of listeriosis. *Proceedings*, edited by I. Ivanov, Varna, 1979. p. 264-80.
15. KRAHE, C. — Abortamento listérico seguido de gestação perturbada. *Hospital*, Rio de J., 77:265-8, 1970.
16. LARSSON, S. — Clinical differences in neonatal listeriosis acquired in utero versus extramaternally. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LISTERIOSIS, 7th, Varna, 1977. Problems of listeriosis. *Proceedings*, edited by I. Ivanov, Varna, 1979. p. 170-1.
17. LIMA, L.S. & SOUZA, N.P. — Estudo clínico e epidemiológico de 50 casos de listeriose no Paraná. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO MÉDICA DO PARANÁ, 2.º, Foz do Iguaçu. 1967. p. 42.
18. MADRUGA, M. — Listeriose. *Rev. Univ. Fed. Est. Rio de Janeiro*, 3:151-66, 1965.

19. MADRUGA, M. — Listeriose (II). *Rev. Univ. Fed. Est. Rio de Janeiro*, 4:159-72, 1966.
20. MASTROLORENZO, L.A.E.; COSTA, M.D.M. & HOFER, E. — *Listeria monocytogenes* sorotipo L 1/2a, isolada de material de aborto humano. [Apresentado ao 4.º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Salvador, 1975] p. 195.
21. MENEZES, D.M.F. — Listeriose congênita. Estudo histopatológico de três casos. *Hospital*, Rio de J., 75:479-98, 1969.
22. MONNET, P. — Listeriosis in a neonatal unit. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LISTERIOSIS, 6th, Leicester, 1974. Problems of listeriosis. *Proceedings*, edited by M. Woodbine, Leicester, Leicester Univ. press, 1975. p. 188-92.
23. NYFELDT, A. — Etiologie de la mononucleose infectieuse. *C.R. Séanc. Soc. Biol.*, 101:590-2, 1929.
24. PACHECO, G. — Faringite listeriosa. *Hospital*, Rio de J., 64:625-8, 1968.
25. PACHECO, G. & AMORIM, N. — Um caso de listeriose em criança. *Bol. Inst. Pueric. Univ. Brasil*, 21:29-34, 1964.
26. PACHECO, G.; DIAS, V.M. & GONDIM, A. — Um caso de listeriose humana. *Rev. bras. Med.*, 17:943-5, 1960.
27. PACHECO, G.; REIS, S.I. & DIAS, V.M. — Listeriose vaginal. *Hospital*, Rio de J., 54:331-4, 1958.
28. PACHECO, G.; RODRIGUES, F. & HOFER, M.B. — Um caso de listeriose crônica. *Hospital*, Rio de J., 72:105-9, 1967.
29. SARAIVA, L.R.; MONTENEGRO, D.; PADILHA, M. & VICTOR, E.G. — Endocardite infecciosa por *Listeria monocytogenes*. A propósito de um caso. *Arg. bras. Cardiol.*, 33:193-5, 1979.
30. SEELIGER, H.P.R. — Listeriosis. 2nd ed. New York, Hafner, 1961. 308 p.
31. SUASSUNA, I.; SANTOS, L.C.; SUASSUNA, I.R. & PINHEIRO, J. — Listeriose do sistema nervoso no Estado da Guanabara. *Anais Microbiol.* (Rio de J.), 16:161, 1969.
32. TAKEUCHI, C.; PESSÓA, G.V.A.; HOFER, E.; MELLES, C.E.A. & RASKIN, M. — Isolamento de *Listeria monocytogenes* de líquido cefalorraquidiano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34:101-7, 1974.

Recebido para publicação em 20 de fevereiro de 1984.

DETERMINAÇÃO POLAROGRAFICA DO ÁCIDO L-ASCÓRBICO EM PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO CONTENDO POLISSORBATO 60 OU 80 *

Odair ZENEBO **
Myrna SABINO **
Maria J. CORRÊA **

RIALA6/583

ZENEBO, O.; SABINO, M. & CORRÊA, M.J. — Determinação polarográfica do ácido L-ascórbico em produtos de panificação contendo polissorbato 60 ou 80. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):133-140, 1984.

RESUMO: Os autores estabeleceram método polarográfico para determinar ácido L-ascórbico na presença de polissorbato 60 ou 80 em produtos de panificação, devido à imprecisão na sua determinação pelos métodos usuais. A oxidação anódica do ácido ascórbico foi realizada em presença da solução-tampão de acetato, pH 4,6. Pelo método proposto foram estudadas interferências de alguns aditivos permitidos nas formulações para panificação e também da substância oxidante, o bromato de potássio.

DESCRITORES: ácido L-ascórbico, determinação em produtos de panificação contendo polissorbato 60 ou 80; pão, produtos, determinação do ácido L-ascórbico por polarografia.

INTRODUÇÃO

O ácido L-ascórbico é usado na indústria de panificação como melhorador de farinhas. Esta substância, utilizada como agente de maturação, cujo uso é permitido pela legislação brasileira⁴, é empregada com a intenção de facilitar melhor manipulação de massas panificáveis, e conceder-lhes maior elasticidade, boa textura e maior volume.

O ácido L-ascórbico age como reforçador do glúten, a principal fração protéica da farinha de trigo, proporcionando massa mais estável para a retenção dos gases liberados durante a fase de fermentação no processamento do pão. Para explicação do fenômeno, admite-se o mecanismo onde, em uma primeira etapa, o ácido ascórbico é oxidado por intervenção da enzima ácido ascórbico oxidase, produzindo ácido deidroascórbico. Este último produto irá oxidar, por ação da enzima ácido deidroascórbico redutase, grupos sulfidrílicos (-SH) da cadeia protéica do

glúten, formando intermolecularmente ligações cruzadas de dissulfetos (-S-S-), proporcionando estrutura mais compacta e ocasionando maior retenção de gases liberados durante a fermentação¹.

Os mais diversos métodos para determinação de ácido ascórbico baseiam-se em seu poder redutor, devido à existência do grupo enediol em sua molécula. Rotineiramente, o método usado é o volumétrico que se fundamenta na redução do iodo liberado durante a oxidação de íons iodeto em meio ácido pela solução de iodato utilizada como reagente titulante¹⁰. Para determinações de pequenas quantidades de ácido ascórbico, utiliza-se o método de Tillmans¹¹. Nestes métodos citados, outros agentes redutores e oxidantes interferem na determinação do ácido ascórbico.

Métodos analíticos para determinação do ácido ascórbico, em muitos tipos de produtos, foram desenvolvidos com base em seu comportamento polarográfico⁵. Esses métodos

* Realizado no Serviço de Química Aplicada do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

fundamentam-se na oxidação do grupo enediol da molécula junto ao eletrodo de mercúrio, em um processo envolvendo dois elétrons.

Foi observado que a onda anódica obtida com o ácido ascórbico era deslocada com relação aos diferentes valores de pH e que a oxidação não era completamente reversível, pois o ácido deidroascórbico não é reduzido no eletrodo de mercúrio⁶. Alguns autores afirmam que grandes concentrações de substâncias tensoativas podem interferir na onda polarográfica do ácido ascórbico⁸.

Normalmente, formulações contendo ácido ascórbico, destinadas ao fabrico de pães pré-embalados, isto é, não destinados ao consumo imediato, apresentam os tensoativos, polissorbato 60 e polissorbato 80, permitidos pela nossa legislação^{2,3}, com a finalidade de conferirem propriedades emulsificantes às massas panificáveis. Na determinação do ácido ascórbico nessas formulações, pelos métodos volumétricos convencionais, o ponto final da titulação não é nítido e nem preciso, devido à interferência dos emulsificantes. DES-SOUKY *et alii*⁷ estabeleceram metodologia para determinação de ácido ascórbico em presença do polissorbato 80, onde o tensoativo é removido por extração com butanol, antes da determinação iodométrica do ácido ascórbico. Este método envolve extração com solvente que, em muitas formulações, pode produzir emulsões difíceis de separação, acarretando erros na determinação do ácido ascórbico.

Tendo em vista a necessidade de uma nova metodologia para determinação rápida e precisa de ácido ascórbico em formulações que contêm polissorbato 60 ou 80, estabelecemos método polarográfico onde foram estudadas interferência dos aditivos monoesterato de polioxietileno-(8)-glicol, propionato de cálcio e estearoil-2-lactil lactato de sódio, permitidos pela legislação brasileira no preparo de produtos de panificação não destinados ao consumo imediato. Devido à impossibilidade de determinar ácido ascórbico em presença de bromato de potássio (aditivo não permitido em nossa legislação), pelos métodos disponíveis, foi estudada a sua interferência no comportamento polarográfico do ácido ascórbico.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Reagentes

Solução eletrólito suporte

Solução-tampão de acetato, Walpore⁶, pH 4,6

Soluções-padrão de ácido ascórbico

Solução I — Dissolver 0,1 g de ácido ascórbico p.a. em água desmineralizada e completar o volume com o mesmo solvente até 100 ml, em balão volumétrico.

Solução II — Transferir 10 ml da solução I para balão volumétrico de 100 ml e completar o volume com solução eletrólito suporte.

Polissorbatos 60 e 80

Monoestearato de polioxietileno(20) sorbitana *

Monoleato de polioxietileno(20)sorbitana *

Aparelho

Polarógrafo Methrom, mod. E 261 R — E 354 S

Condições instrumentais: voltagem inicial, 1 V; escala de voltagem, 0; sensibilidade, 1×10^{-7} A/mm; tempo de gotejamento, 3 s; amortecimento, 0; compensação de carga, 0; corrente de carga, 0; eletrodo de referência, Ag/AgCl.

Método

a) *Efeito dos polissorbatos 60 e 80 na onda polarográfica do ácido ascórbico*

Procedimento — Transferir 10 ml da solução-padrão II de ácido ascórbico para uma série de 14 balões volumétricos de 100 ml. Colocar nos sete primeiros balões, respectivamente, 0, 2, 10, 100, 1.000 e 10.000 mg de polissorbato 60 e, nos balões restantes, colocar polissorbato 80 nas mesmas quantidades acima mencionadas. Completar o volume de todos os balões com a solução do eletrólito suporte e transferir alíquotas de 20 ml de cada uma das soluções para celas polarográficas. Borbulhar nitrogênio durante 5 minutos. Sendo necessário, adicionar uma gota de álcool etílico p.a. para reprimir a formação de espuma. Registrar os polarogramas de cada uma das soluções e calcular as correntes de difusão.

b) *Verificação da linearidade da concentração de ácido ascórbico em função da corrente de difusão*

Procedimento — Transferir, para balões volumétricos de 100 ml, alíquotas correspondentes aos volumes de 1, 2, 4, 10, 15, 20 e 25 ml da solução de ácido ascórbico (solução I) e, em cada um dos balões, adicionar água desmineralizada. Colocar em todos os balões 1 ml de solução aquosa de polissorbato 80, a 0,1% (p/v), e completar os volumes finais

* Tensoativos fabricados por Nutricional Biochemicals Corporation, USA.

com solução de eletrólito suporte. Pipetar 20 ml de cada uma das soluções, colocar em celas polarográficas e, após o borbulhamento do nitrogênio, por cinco minutos, registrar os polarogramas e medir as respectivas correntes de difusão. Paralelamente, desenvolver o polarograma com uma solução designada branco, constituída de 25 ml de água desmineralizada, 1 ml de solução de polissorbato 80, a 0,1%, e solução de eletrólito suporte até completar o volume de 100 ml.

c) *Verificação da interferência de algumas substâncias químicas na onda polarográfica do ácido ascórbico*

Procedimento — Utilizar quatro balões volumétricos de 100 ml contendo cada um a mistura constituída de 10 ml de solução-padrão de ácido ascórbico (solução II) e 1 ml da solução de polissorbato 80, a 0,1%; colocar em cada um deles, respectivamente, 1 g das seguintes substâncias: estearoil-2-lactil lactato de sódio, monoestearato de polioxietileno (8) glicol, propionato de cálcio e bromato de potássio. Completar os volumes com solução eletrólito suporte, homogeneizar e registrar os polarogramas como anteriormente.

d) *Determinação quantitativa do ácido ascórbico*

Preparo da amostra — Pesar determinada quantidade da amostra, correspondente a 100 mg de ácido ascórbico, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 ml e completar o volume com água desmineralizada. Após a homogeneização, se houver algum material não dissolvido, filtrar imediatamente a solução, na ausência de luz direta. Transferir 10 ml dessa solução para balão volumétrico de 100 ml e completar o volume com solução do eletrólito suporte.

Preparo do padrão — Transferir 10 ml da solução-padrão de ácido ascórbico (solução I) para balão volumétrico de 100 ml. Adicionar à solução determinada quantidade de polissorbato 60 ou 80 correspondente àquela existente na tomada da amostra, e completar o volume com solução do eletrólito suporte.

Determinação do ácido ascórbico — Pipetar 20 ml da solução da amostra, colocar em uma cela polarográfica; colocar o mesmo volume da solução-padrão em outra cela. Remover o oxigênio dissolvido por borbulhamento de nitrogênio puro e registrar os polarogramas

nas condições instrumentais preestabelecidas. Determinar os valores das alturas das respectivas ondas polarográficas. Calcular a concentração de ácido ascórbico na amostra pela relação:

$$\frac{10.000 \text{ } ^hA}{x \text{ } ^hP} = cA$$

hA e hP = alturas, respectivamente, das ondas polarográficas da solução da amostra e da solução do padrão.

cA = concentração de ácido ascórbico, em mg/100 ml.

x = peso da amostra analisada.

RESULTADOS

Os efeitos dos emulsificantes polissorbatos 60 e 80, na onda polarográfica do ácido ascórbico, estão representados nas figuras 1 e 2 (p. 136 e 137). A onda anódica apresenta um máximo que é suprimido na presença do polissorbato 60, na concentração de 10 mg/100 ml e, na presença do polissorbato 80, na concentração de 2 mg/100 ml.

Observando-se a tabela (p. 138), pode-se afirmar que, até a concentração de 100 mg/100 ml, os emulsificantes praticamente não influíram na onda polarográfica do ácido ascórbico e que, em concentrações elevadas, houve um decréscimo pronunciado no valor de sua altura.

Para o estabelecimento de um método polarográfico é condição necessária a verificação da linearidade entre as concentrações das substâncias analisadas e as respectivas correntes de difusão, calculadas a partir dos polarogramas registrados, em determinadas condições instrumentais impostas. As figuras 3 e 4 (p. 138 e 139) representam, respectivamente, os polarogramas registrados e a curva correspondente à linearidade entre as concentrações de ácido ascórbico e as correntes de difusão, demonstrando que houve obediência à equação de Ilkovic (MEITES⁹).

O estudo das interferências das substâncias testadas em concentrações elevadas com relação ao ácido ascórbico, não revelou nenhuma alteração nas suas ondas anódicas, demonstrando a perfeita aplicação do método proposto às formulações de panificação.

O teste de recuperação do ácido ascórbico, de acordo com o método estabelecido, variou de 99 a 100%, indicando ser de precisão suficiente para sua determinação em formulações contendo os citados tensoativos.

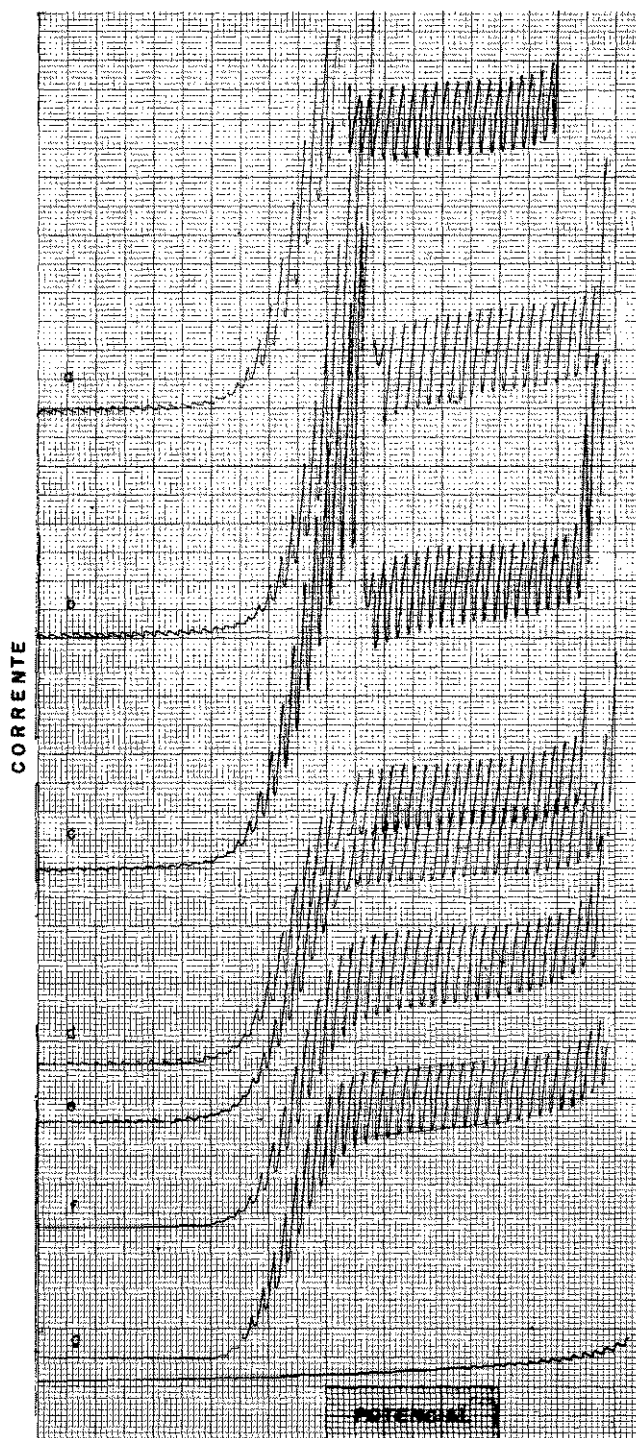


FIGURA 1 — Efeito do polissorbato 80 na onda anódica do ácido ascórbico: a) sem polissorbato 80; b) com 0,1 mg de polissorbato 80; c) com 0,2 mg de polissorbato 80; d) com 0,4 mg de polissorbato 80; e) com 2 mg de polissorbato 80; f) com 20 mg de polissorbato 80; g) com 200 mg de polissorbato 80; h) eletrólito suporte com polissorbato 80 (corrente residual).

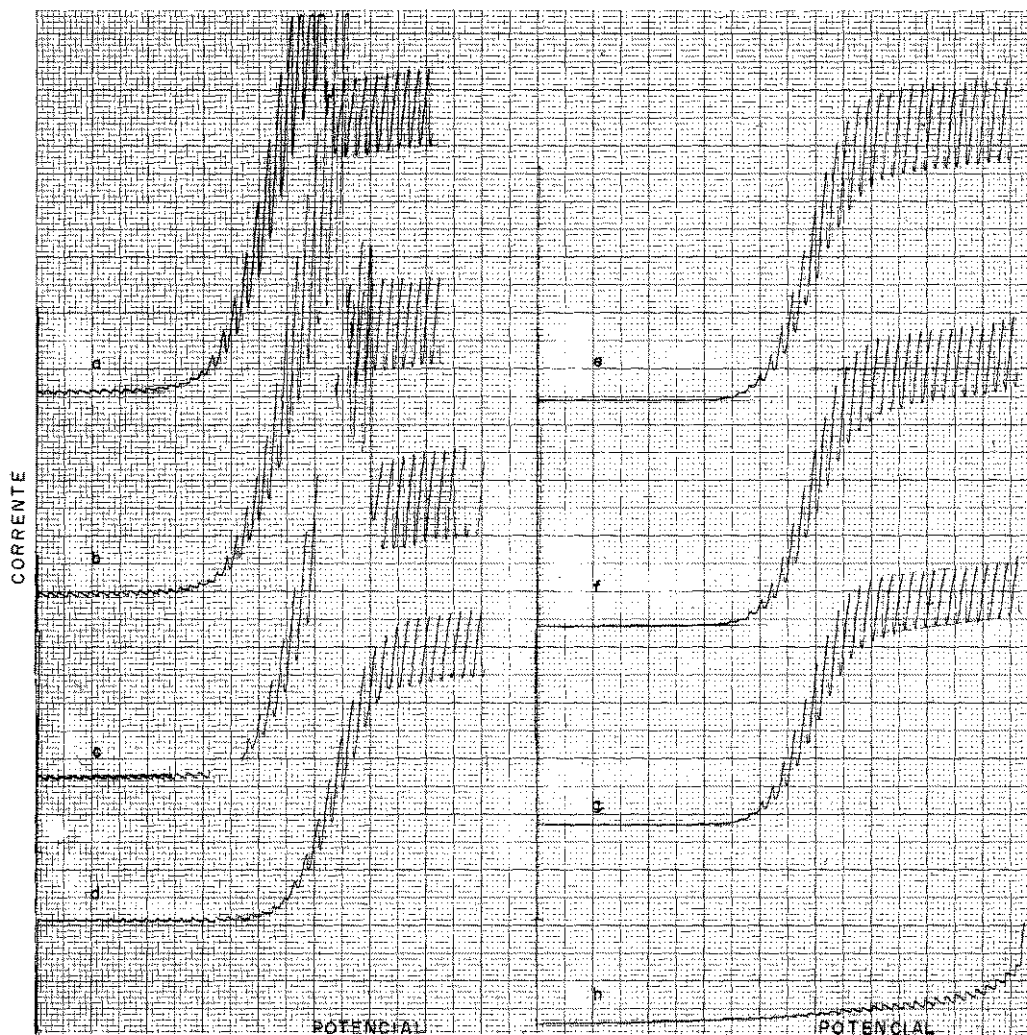


FIGURA 2 — Efeito do polissorbato 60 na onda anódica do ácido ascórbico: a) sem polissorbato 60; b) com 0,1 mg de polissorbato 60; c) com 0,2 mg de polissorbato 60; d) com 0,4 mg de polissorbato 60; e) com 2 mg de polissorbato 60; f) com 20 mg de polissorbato 60; g) com 200 mg de polissorbato 60; h) eletrólito suporte com polissorbato 60 (corrente residual).

TABELA

Efeito das concentrações dos polissorbatos 60 e 80 na altura da onda anódica do ácido ascórbico

Polissorbato 60 mg/100 ml	Altura da onda cm	Polissorbato 80 mg/100 ml	Altura da onda cm
0,0	4,8	0,0	4,8
0,5	4,8	0,5	4,8
1,0	4,8	1,0	4,8
2,0	4,8	2,0	4,7
10,0	4,8	10,0	4,8
100,0	4,8	100,0	4,7
1.000,0	4,6	1.000,0	4,6
10.000,0	3,9	10.000,0	3,5

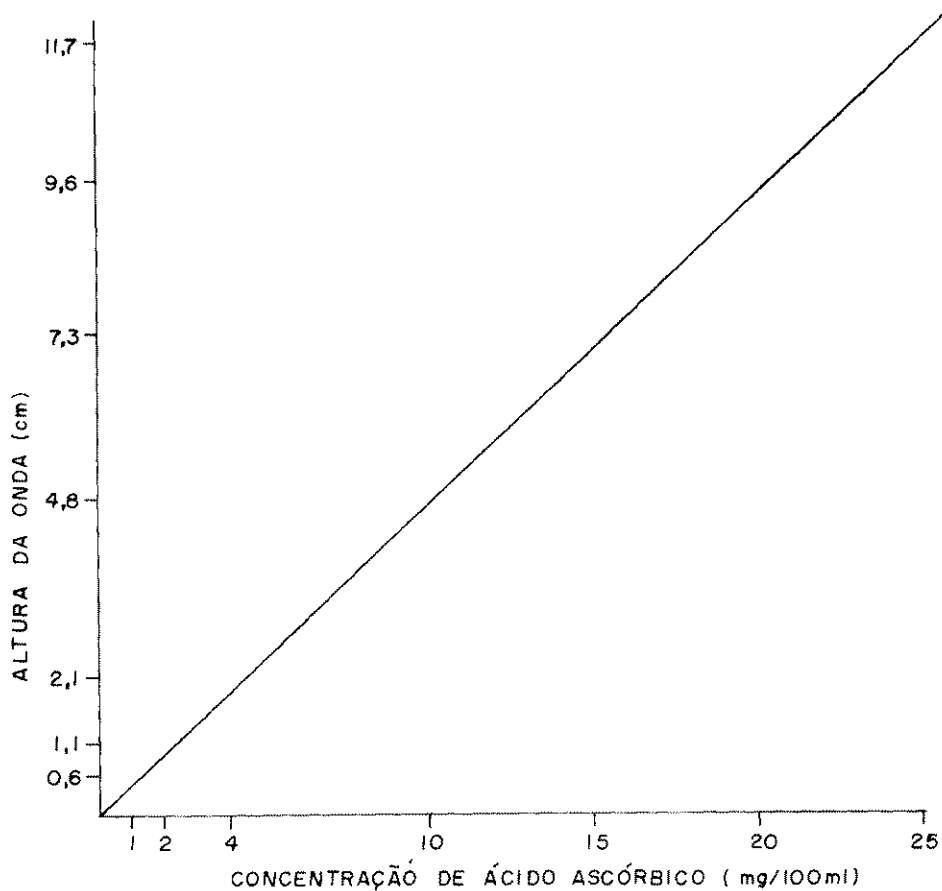


FIGURA 3 — Curva-padrão de soluções de ácido ascórbico.

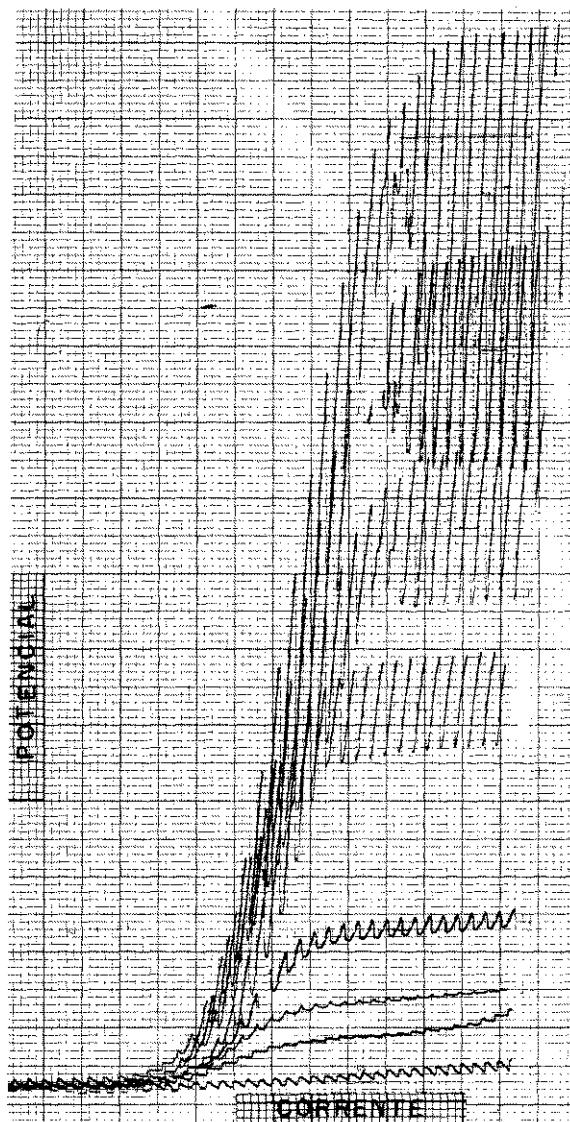


FIGURA 4 — Polarograma de soluções-padrão de ácido ascórbico.

CONCLUSÃO

O método proposto para determinar ácido ascórbico em produtos de panificação que contêm polissorbato 60 ou 80 é adequado à rotina pela sua simplicidade, rapidez e precisão. Neste método, não há destruição da amostra analisada, podendo ser esta utili-

zada várias vezes para verificação de seu comportamento polarográfico. Outra razão para o emprego do referido método é a vantagem de fornecer, além do resultado quantitativo, informação qualitativa da substância analisada, revelada pelo valor do potencial de meia-onda. Os demais métodos não são específicos e neles qualquer outro agente redutor presente poderia ser dosado.

RIALA6/583

ZENEON, O.; SABINO, M. & CORRÊA, M.J. — Polarographic determination of ascorbic acid in bread products containing polysorbate 60 or 80. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):133-140, 1984.

ABSTRACT: The polarographic method was employed for determination of ascorbic acid in the presence of Polysorbate 60 or 80 in bread products because of the lack of precision of the usual procedures. Anodic oxydation of ascorbic acid was made in the presence of acetate buffer solution at pH 4.6. The interference of some food additives permitted for bread products and of potassium bromate were studied.

DESCRIPTORS: L-ascorbic acid, determination in bread products containing polysorbate 60 or 80; bread products, ascorbic acid determination by polarography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUERNFEIND, J.C. & PINKERT, D.M. — Food processing with added ascorbic acid. In: CHICHESTER, C.O.; MRAK, E.M. & STEWART, G.F., ed. — *Advances in food research*. New York, Academic press., 1970. v. 18, p. 219-305.
2. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução n.º 10/69 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 16 set. 1970. Seção I, pt. I, p. 8059. Permite o uso, como estabilizantes e agentes de dispersão, dos ésteres de sorbatana com ácidos graxos comestíveis...
3. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução n.º 24/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 6 set. 1977. Seção I, pt. I, p. 11810. Estende o emprego de Polissorbato 80 (mono-oleato de polioxietileno 20) sorbitana, como estabilizante...
4. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução n.º 38/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 21 dez. 1977. Seção I, pt. I, p. 17594. Aprova como coadjuvantes da tecnologia de fabricação as substâncias constantes dos anexos I, II, III e IV, destinadas ao fabrico dos produtos fornecidos.
5. BREZINA, M. & ZUMAN, P. — *Polarography in medicine, biochemistry and pharmacy*. Translated from the Czech by S. Wanzonek. Rev. English ed. New York, Interscience publ., 1958. p. 401-22.
6. Ibid. p. 731.
7. DESSOUKY, Y.M.; HUSSEIN, F.T. & ISMAIEL, S.A. — Determination of ascorbic acid in the presence of polysorbate 80. *Pharmazie*, 28:791-2, 1973 apud *Anal. Abstr.*, 27(1), 1974. [Abstr. 368]
8. KOLTHOFF, I.M. & LINGANE, J.J. — *Polarography*. 2nd ed, New York, Interscience publ., 1952. v. 2, p. 727-8.
9. MEITES, L. — *Polarographic techniques*. 2nd ed., 2nd print. New York, Interscience publ., 1967. p. 114.
10. SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. v. 1: *métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3^a ed, São Paulo, 1985. p. 393-5.
11. STROHECKER, R. & HENNING, H.M. — *Vitamin assay: tested methods*. Translated by D.D. Libman. 2nd print. rev., 1966. Darmstadt, Verlag Chemie, 1966, p. 231-3.

Recebido para publicação em 20 de fevereiro de 1984.

ESTUDO COMPARATIVO DOS MÉTODOS DO ELETRODO SELETIVO E DA REDUÇÃO PELA COLUNA DE CÁDMIO PARA A DETERMINAÇÃO DE NITRATO EM ÁGUA MINERAL *

Jorge J. do Vale OLIVEIRA **

Odair ZENEBO **

Cecília C. M. dos SANTOS **

RIALAG/584

OLIVEIRA, J.J.V.; ZENEBO, O. & SANTOS, C.C.M. — Estudo comparativo dos métodos do eletrodo seletivo e da redução pela coluna de cádmio para a determinação de nitrato em água mineral. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):141-147, 1984.

RESUMO: Foram feitas dosagens de nitrato em águas minerais pelos métodos da adição de padrão e da curva-padrão com o eletrodo seletivo e os resultados foram comparados com os obtidos pela técnica da redução pela coluna de cádmio. Estudo da interferência de íons cloreto na determinação de nitrato pelo processo potenciométrico foi também efetuado neste trabalho. Os resultados obtidos pelos dois métodos analíticos testados foram satisfatórios e bastante semelhantes, sendo que para análise de rotina o método do eletrodo seletivo é o recomendado.

DESCRITORES: nitrato em água mineral, determinação; água mineral, determinação de nitrato; método do eletrodo seletivo, método da redução pela coluna de cádmio, comparação.

INTRODUÇÃO

A detecção de nitrato em água mineral poderá ser um indicador de poluição, pois sua presença está condicionada ao estágio final da oxidação de compostos orgânicos nitrogenados, sugerindo que ela esteve em contato com material protéico em decomposição. Evidentemente, esta afirmação não é válida, quando o nitrato presente na água for de origem mineral comprovada⁵.

O teor de nitrato na água pode ser avaliado diretamente por reação com diferentes reagentes cromogênicos e posterior leitura espectrofotométrica.

Entre os métodos colorimétricos usados para este fim, está o que utiliza o ácido fenoldissulfônico⁹. Bastante preciso, e também muito utilizado para determinar nitrato em vários tipos de amostra, é o método que se baseia na redução do nitrato por intermédio de coluna de cádmio e posterior deter-

minação colorimétrica do nitrito formado, com reação de diazotização com ácido sulfanílico e alfa-naftol⁶.

O método potenciométrico para determinação de nitrato utiliza eletrodo seletivo para a medida da quantidade do referido íon. Muitos pesquisadores já utilizaram esta técnica para determinação de nitrato em diferentes tipos de amostras, devido à simplicidade, precisão e rapidez quando comparado com métodos colorimétricos^{3, 7, 8}. BRINKHOFF⁴ realizou estudo, com relação à determinação de nitrato, para verificar a qualidade da água de superfície e da água tratada e, comparando os resultados com os de outros métodos colorimétricos clássicos, chegou à conclusão de que o método potenciométrico era o mais adequado para análise de rotina.

Devido à necessidade de se padronizar um método adequado para determinação rotineira de nitrato em água mineral, os autores deste

* Realizado na Seção de Equipamentos Especializados do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

trabalho empreenderam estudo comparativo entre os métodos considerados mais precisos o potenciométrico, em que se usa eletrodo seletivo, e o da redução pela coluna de cádmio. Visto que o íon cloreto é considerado sério interferente na seletividade do eletrodo seletivo para nitrato¹, foi também realizado estudo para verificar sua real interferência na determinação potenciométrica de nitrato em água mineral.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de água mineral de diferentes marcas, comercializadas na cidade de São Paulo, para estudo comparativo das duas metodologias propostas para a determinação de nitrato.

1. Método da coluna de cádmio

Foi usado o método descrito por LARA *et alii*⁶, no qual não é necessário o tratamento prévio da amostra.

Reagentes

Solução de sulfato de cádmio a 20%, p/v
Zinco em bastão

Solução tampão (pH 9,6-9,8): adicionar 20 ml de ácido clorídrico a 500 ml de água destilada. Agitar. Adicionar 50 ml de hidróxido de amônio concentrado e completar o volume de 1.000 com água destilada.

Solução de α -naftol: aquecer 360 ml de água destilada e 500 ml de ácido acético a 50°C e transferir para um frasco escuro contendo 0,25 g de ácido sulfanílico. Agitar até dissolver. Adicionar 0,20 g de α -naftol, agitar bem. Esfriar à temperatura ambiente. Adicionar 90 ml de solução de hidróxido de amônio a 10%. O pH desta solução deve ser $4,0 \pm 0,5$.

Preparo da coluna

Estirar uma das pontas de um bulbo de vidro de 1,5 cm de diâmetro e 14 cm de comprimento. Adaptar ao topo de uma coluna um funil de separação de 60 ml, com haste de 1 mm de diâmetro interno e 24 cm de comprimento (fig. 1). Colocar bastões de zinco em um béquer contendo cerca de 100 ml da solução de cádmio a 20%. Após 3 horas, remover o depósito esponjoso formado, e colocá-lo em um béquer contendo água destilada. Transferir o cádmio formado para o copo de um liquidificador, com a ajuda de aproximadamente 200 ml de água destilada, e triturar, durante um a dois segundos. Passar no tamis de 20 a 40 malhas. Colocar na extremidade afilada da coluna um pouco de lã de vidro seguida de uma camada de 1 cm de areia e transferir o cádmio para até quase o topo da mesma, mantendo-a sempre com água para evitar a entrada de ar.

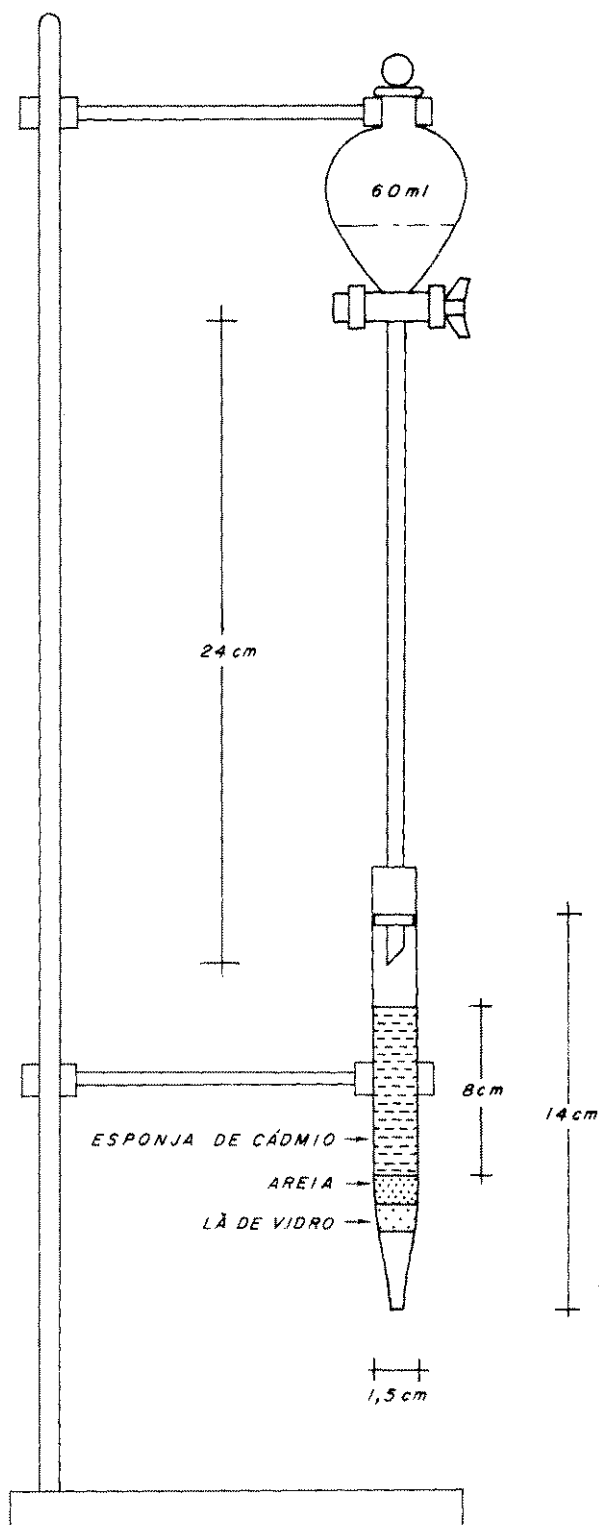


FIGURA 1 — Coluna de cádmio.

Eficiência da coluna: testar a eficiência da coluna passando soluções-padrão de nitrato de sódio através da mesma, determinar a quantidade de nitrito formado, de acordo com o procedimento descrito adiante, e calcular a porcentagem de recuperação. Os dados obtidos com a coluna por nós usada estão na tabela 1, na página 145.

Preparo da curva-padrão de nitrito de sódio

Pesar 0,01 g de nitrito de sódio e dissolver em 1.000 ml de água destilada. Pipetar alíquotas da solução, correspondentes ao conteúdo de 4 a 40 μg de NO_2^- em balões volumétricos de 25 ml. Adicionar 5 ml da solução tampão, 10 ml da solução de α -naftol e completar o volume com água destilada. Deixar os balões durante 30 minutos à temperatura de 25 a 30°C. Esfriar à temperatura ambiente e ler em espectrofotômetro em cela de 1 cm a 474 nm, usando como branco a solução contendo 10 ml do reagente para desenvolver cor, 5 ml da solução-tampão e 10 ml de água destilada. Com os valores obtidos construir a curva-padrão.

Procedimento

Lavar a coluna de cádmio com 25 ml de ácido clorídrico 0,1 N, em seguida, com 50 ml de água destilada e, finalmente, com 25 ml de solução-tampão diluída a 1:9, com água destilada. Pipetar 30 ml da amostra a ser analisada no funil de separação e passar pela coluna de cádmio a uma velocidade de 5 ml/min. Passar água destilada através da coluna até recolher 100 ml do eluado em balão volumétrico, tomando o cuidado para que a coluna não seque. Pipetar uma alíquota, no máximo de 10 ml do eluado, para balão volumétrico de 25 ml, adicionar 5 ml da solução tampão, 10 ml da solução de α -naftol. Deixar 30 minutos em banho de água a 25-30°C. Esfriar à temperatura ambiente, fazer a medida da absorbância em cela de 1 cm em espectrofotômetro, usando como branco uma solução contendo 10 ml do reagente para desenvolver cor, 5 ml da solução-tampão, e água destilada. Calcular o valor do nitrito, usando a curva-padrão pré-estabelecida.

2. Método do eletrodo seletivo

Reagentes

Solução-tampão: dissolver 6,66 g de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$; 1,94 g de ácido sulfâmico em cerca de 40 ml de água destilada. Ajustar o pH a 3,0, acrescentando lentamente solução de hidróxido de sódio 0,1 N e completar o volume para 1.000 ml com água destilada.

Solução-padrão de nitrato de sódio, 1.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Solução-padrão de cloreto de sódio, 1.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Equipamentos

Analizador de íons, Orion, mod. 901

Eletrodo seletivo para nitrato, Orion, mod. 93-07

Eletrodo de referência de dupla junção, Orion, mod. 90-2

Agitador magnético

Procedimentos

a) **Curva-padrão** — Pipetar alíquotas de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 ml da solução-padrão de nitrato de sódio, 1.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, e transferi-las respectivamente para balões volumétricos de 100 ml contendo 2 ml da solução-tampão, completar o volume com água desmineralizada, e homogeneizar. Transferir os conteúdos dos balões para béqueres de 150 ml e mergulhar os eletrodos na solução a uma profundidade de 3 cm aproximadamente. Agitar menamicamente a solução e, após a estabilização da mesma, registrar a leitura do potencial do eletrodo no aparelho analisador de íons. Construir a curva-padrão em papel semi-logarítimo, onde os potenciais do eletrodo das soluções-padrão são colocados no eixo linear e as respectivas concentrações, no eixo logaritmico (fig. 2, p. 144). Transferir 2 ml da solução-tampão para cada um dos 10 balões volumétricos de 100 ml. Completar o volume com a amostra a ser analisada e homogeneizar. Fazer a leitura de acordo com o que foi descrito acima e calcular a concentração de nitrato usando a curva-padrão pré-estabelecida.

b) **Adição do padrão** — Colocar 2 ml da solução-tampão em balão volumétrico de 100 ml e completar o volume com a amostra a ser analisada. Transferir o conteúdo desta solução para um béquer de 150 ml e registrar o potencial do eletrodo, antes e após a adição de 1 ml da solução-padrão de nitrato de sódio, conforme descrito em 2a.

Calcular a concentração de nitrato da amostra analisada por intermédio da equação²:

$$\frac{C_A \quad x \quad V_A}{V_x (10^{\Delta E/S} - 1)} = C_x$$

C_A = concentração de nitrato na amostra

V_A = volume de nitrato na amostra

V_x = volume total do nitrato após adição do padrão

ΔE = diferença do potencial antes e após adição do padrão (O ΔE deve estar no intervalo de 10 a 30 mV)

S = Slope do eletrodo do nitrato *

* Alteração no valor do potencial do eletrodo, observado quando a concentração varia por um fator 10.

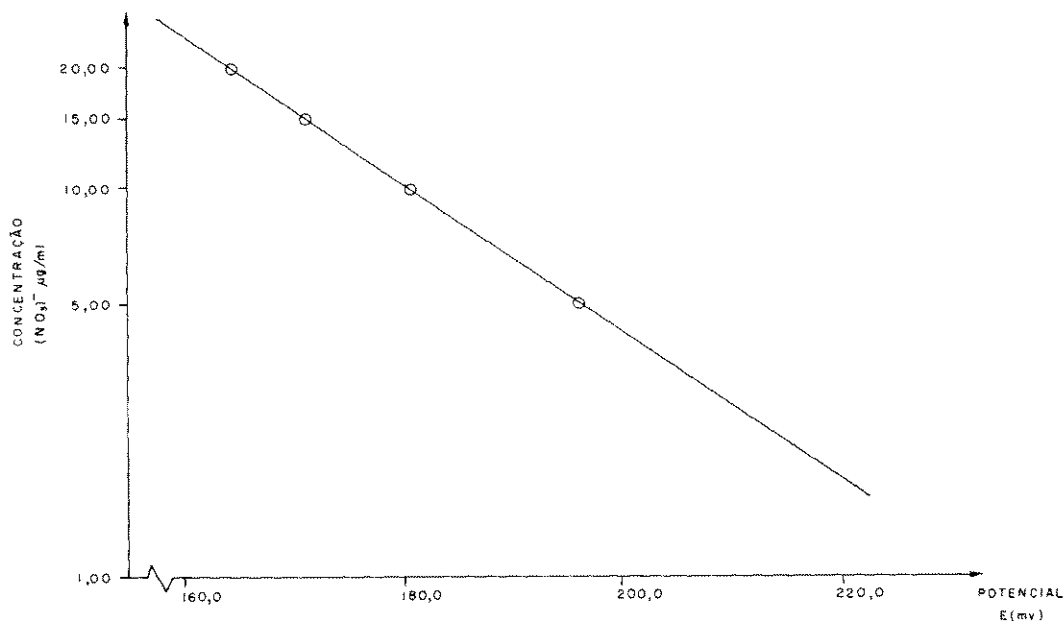


FIGURA 2 — Curva-padrão de nitrato.

Análise da interferência de íons cloreto na determinação de nitrato

Em 11 balões volumétricos de 100 ml, contendo 2 ml de solução-tampão e 1 ml da solução-padrão de nitrato de sódio (1.000 μg/ml), colocar respectivamente 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,7; 0,8; 1,0; 1,5; 3,0; 4,0 e 5,0 ml da solução-padrão de cloreto de sódio (1.000 μg/ml). Completar o volume com água destilada e fazer as leituras dos potenciais do eletrodo em cada uma das soluções, como foi descrito anteriormente.

RESULTADOS

A eficiência da coluna de cádmio na determinação do nitrato está comprovada pela recuperação do ânion, conforme a tabela 1.

A curva-padrão que relaciona o logaritmo das concentrações de nitrato e as respectivas leituras dos potenciais do eletrodo estão representadas na figura 2 e fornecem a base da determinação quantitativa.

Os níveis de nitrato nas amostras de água mineral obtidos por análises em duplicata pelos métodos do eletrodo específico, processo da curva-padrão, da adição de padrão e da coluna de redução de cádmio são mostrados na tabela 2.

TABELA 1

Eficiência da coluna na recuperação de nitrato

Quantidade de NO ₃ ⁻ passada na coluna μg	Valor teórico de NO ₃ ⁻ correspondente a NO ₃ ⁻ μg	Valor encontrado em NO ₃ ⁻ μg	Recuperação %
4,5	3,33	3,33	100,00
6,0	4,45	4,35	97,75
7,5	5,56	5,56	100,00
10,5	7,79	7,68	98,69
12,0	8,90	8,90	100,00

OLIVEIRA, J.J.V.; ZENEON, O. & SANTOS, C.C.M. — Estudo comparativo dos métodos do eletrodo seletivo e da redução pela coluna de cádmio para a determinação de nitrato em água mineral. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):141-147, 1984.

TABELA 2

Teores de nitrato em águas minerais determinados pelos métodos da coluna de cádmio e do eletrodo seletivo

Nitrato em águas minerais			
Amostra	Eletrodo seletivo		Coluna do cádmio µg/ml
	Curva-padrão µg/ml	Adição do padrão µg/ml	
1	16,00	16,69	16,42
2	(...)	11,17	10,83
3	8,59	8,19	7,96
4	7,10	7,88	7,90
5	7,00	7,31	7,00
6	2,95	3,17	3,14
7	2,10	2,46	1,41
8	14,51	14,28	14,65
9	3,75	4,21	3,92
10	2,78	3,89	2,56
11	2,05	2,66	2,19

(...) = teor não determinado.

TABELA 3

Interferência dos íons cloreto na seletividade do eletrodo seletivo para íons nitrato

Concentração da solução-padrão de cloreto adicionada µg/ml	Concentração da solução-padrão de nitrato adicionada µg/ml	Concentração de nitrato encontrada µg/ml
0,00	10,00	9,61
1,00	10,00	10,02
2,00	10,00	9,49
4,00	10,00	9,61
8,00	10,00	9,87
7,00	10,00	10,13
10,00	10,00	10,13
15,00	10,00	9,99
30,00	10,00	9,87
40,00	10,00	9,74
50,00	10,00	9,38

DISCUSSÃO

Analisando os valores de nitrato obtidos pelas duas metodologias testadas nas amostras de água mineral, observamos boa aproximação nos resultados, indicando serem métodos adequados para a determinação do referido íon.

O método da coluna de cádmio em rotina de laboratório é limitado em sua operacionalidade, pois fatores como a constante verificação da capacidade redutora da coluna e o controle de seu fluxo de escoamento exigem do analista atenção contínua durante todo o curso da experiência, o que caracteriza a técnica como desgastante e demorada. Tais aspectos poderiam explicar algumas discordâncias observadas nos resultados da tabela 2. No entanto, uma vantagem deve ser salientada no emprego de tal método, que é a não interferência de ânions na determinação do nitrato, tornando-o indicado para analisar amostras diferentes.

A técnica potenciométrica para a determinação de nitrato em água mineral é preferível, considerando-se a rapidez da análise e a simplicidade da metodologia, sendo necessário apenas um simples tratamento prévio da amostra. Tais vantagens analíticas tornam o método adequado em análise de rotina, quando o teor de cloreto se enquadra na faixa dos valores apresentados na tabela 3. Nesta tabela, os teores de cloreto encontrados nas amostras analisadas estavam abaixo de 50 $\mu\text{g/ml}$; portanto, a sua interferência na seletividade do eletrodo poderá ser negligenciada em função dos valores obtidos.

CONCLUSÃO

Das metodologias estudadas para a determinação de nitrato em águas minerais, a mais adequada é a do eletrodo seletivo, sendo o procedimento da adição de padrão mais apropriado à rotina analítica.

RIALA6/584

OLIVEIRA, J.J.V.; ZENEON, O. & SANTOS, C.C.M. — Comparative study of the specific potentiometric electrode and the reduction in cadmium-column method for determination of nitrates in mineral water. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):141-147, 1984.

ABSTRACT: Nitrates were determined in mineral water by standard addition and standard curve with the selective potentiometric electrode. The results were compared with those obtained by the technique of reduction in cadmium-column. The interference of chloride ions in the potentiometric method was also studied. The comparison showed similar results of both methods but the selective electrode procedure seems to be more appropriate for routine determinations.

DESCRIPTORS: nitrate in mineral water, determination; mineral water, determination of nitrate; selective electrode method, cadmium-column method, comparison.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAILEY, L.P. — *Analysis with ion-selective electrodes*. London, Heyden, 1978. p. 140.
2. *Ibid.* p. 187.
3. BARRADO, E.; BERNAL, J.L. & DEBÁN, L. — Electrodo selectivo de nitratos. II. Aplicaciones. *Afinidad*, Espanha, 38:209-14, 1981.
4. BRINKHOFF, H.C. — Analysis of the nitrate content of surface water and effluent water. Application of a plastic-membrane nitrate-selective electrode in water quality monitors. *Environ. Sci. Technol.*, 12:1392-94, 1978.
5. FALCÃO, H. — *Perfil analítico de águas minerais*. Rio de Janeiro, Depart. Nac. Produção Animal, 1978. p. 14-15. (Bol. n.º 49, vol. II)
6. LARA, W.H.; TAKAHASHI, M.Y. & YABIKU, H.Y. — Níveis de nitratos em alimentos infantis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40:147-52, 1980.
7. MILHAM, P.J.; AWAD, A.S.; PAULL, R.E. & BULL, J.H. — Analysis of plants, soils and waters for nitrate by using an ion-selective electrode. *Analyst*, 95:751-7, 1970.

OLIVEIRA, J.J.V.; ZENEON, O. & SANTOS, C.C.M. — Estudo comparativo dos métodos do eletrodo seletivo e da redução pela coluna de cádmio para a determinação de nitrato em água mineral. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):141-147, 1984.

8. PAUL, J.L. & CARLSON, R.M. — Nitrate determination in plant extracts by the nitrate electrode. *J. agric. Food Chem.*, 16:767-8, 1968.

9. SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. v. 1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.^a edição. São Paulo, 1985.

Recebido para publicação em 20 de fevereiro de 1984.

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE FOSFINA EM ALIMENTOS *

Heloisa H. C. BARRETTO **
Odete N. K. INOMATA **
Walkyria H. LARA **

RIALA6/585

BARRETTO, H.H.C.; INOMATA, O.N.K. & LARA, W.H. — Determinação de resíduos de fosfina em alimentos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):149-153, 1984.

RESUMO: Fosfina é um fumigante que está sendo usado em nosso país em larga escala. Como é tóxico a bem baixas concentrações, é necessário que se controlem os alimentos em que foi aplicado. Quarenta e cinco amostras de alimentos variados foram analisadas pelo método espectrofotométrico, sendo que em 77,8% destas foram encontrados resíduos. Os níveis variaram entre um máximo de 5,50 mg/kg e um mínimo de 0,01 mg/kg.

DESCRITORES: fosfina, resíduos, determinação em alimentos; contaminantes em alimentos, resíduos de fosfina.

INTRODUÇÃO

Os fumigantes são usados no controle dos insetos, roedores e nematóides. Como geralmente são gases, eles possuem a propriedade de penetrar em áreas às vezes inatingíveis por outros pesticidas. Seu uso está ligado principalmente à área de expurgo de grãos, a granel ou em sacos, em silos ou armazéns.

O fumigante pode causar um problema pela poluição do ar ou contaminação de alimentos pois, apesar de sua grande volatibilidade, seus resíduos podem persistir em produtos alimentares tratados.

No uso crescente dos fumigantes tem-se destacado a utilização de produtos que liberam fosfina.

Estes fumigantes vêm sob a forma de tabletes ou comprimidos de fosfeto de alumínio o qual, em contato com o ar, reage por hidrólise, liberando fosfina. Esta reação é realizada lentamente, sendo necessários de

dois a cinco dias para que o tablete se decomponha.

Fosfina é um gás altamente venenoso para o homem, mas seu mecanismo de ação no organismo humano ainda não é bem conhecido. Parece causar uma depressão do sistema nervoso central, irritação dos pulmões, dando edema pulmonar e dilatação no coração³.

Provas de toxicidade por inalação em ratos acusam uma concentração letal LC_{50} de 11 ppm em quatro horas, e uma concentração tóxica para humanos TC_{LO} de 8 ppm em uma hora³. Estudos mostram que uma exposição, mesmo a baixa concentração, pode levar a um envenenamento crônico. Uma concentração máxima aceitável (MAC) é de 0,18 mg/m³ na Alemanha, e de 0,54 mg/m³ nos Estados Unidos da América⁴.

De acordo com a legislação em vigor¹, fosfina pode ser usada em expurgo de grãos armazenados de amendoim, arroz, aveia, cacau, café, cevada, feijão, girassol, milho,

* Realizado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

soja, sorgo e trigo, com as seguintes tolerâncias:

Grãos armazenados	0,1 ppm
Farinha preparada a partir de grãos	0,01 ppm
Cacau	0,01 ppm
Café	0,1 ppm
Girassol (sementes)	0,1 ppm

Poucos são os dados a respeito de resíduos de fumigantes em alimentos em nosso país. Café, um dos produtos de grande comércio do Brasil, tem sido tratado em armazéns, tanto do Instituto Brasileiro do Café como do porto de Santos, com vários produtos como brometo de metila, malation e, atualmente, malation e deltametrina (K-biol). Quando há infestação de carunchos, a fumigação é feita com fosfina. Até hoje nunca houve problemas com resíduos de fosfina em café, pois esse tratamento é feito por técnicos especializados, e com rigoroso controle.

Entre as amostras recebidas para análise de resíduos de fosfina, na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz, foi verificado que, em amostras de arroz, soja, amendoim, cacau, chocolate, banana e alho, o uso de fosfina nestes produtos era evidente.

O método utilizado para determinar resíduos de fosfina foi o que se baseia na liberação da fosfina em presença de ácido sulfúrico diluído, recebida em água de bromo. A fosfina é oxidada pelo bromo, passando a fosfato, que é determinado colorimetricamente².

MATERIAL E MÉTODO

Foram analisadas 45 amostras de diferentes espécies de alimentos da região da Grande São Paulo.

Material

Conjunto para destilação: balão de fundo redondo de 1.000 ml com duas bocas laterais de 24/40 e uma central de 45/50; frascos lavadores de gases; banho-maria; cilindro de nitrogênio. Montar em capela, conforme figura da página seguinte.

Funil de separação de 500 ml

Tubos graduados

Frascos de Kjeldahl de 800 ml

Espectrofotômetro

Nota — Todo o material de vidro deverá ser lavado com solução aquosa de HCl 6 N e posterior lavagem com água bidestilada.

Reagentes

Sulfato de hidrazina a 0,15%

Molibdato de amônio a 2,5%

Solução-padrão de KH_2PO_4 (8 $\mu\text{g/ml}$ de fósforo)

Ácido sulfúrico a 10%

Comprimido de Gastoxin ou Fostoxin

Nota — Todos os reagentes deverão ser preparados com água bidestilada.

Procedimento

Transferir 300 g da amostra para o frasco de três bocas do conjunto de destilação e, com o auxílio de um funil de separação, adaptado à boca central, adicionar 300 ml de H_2SO_4 a 10%. Colocar cerca de 150 ml de água de bromo saturada em cada um dos frascos lavadores de gases. Borbulhar nitrogênio durante 30 minutos e, em seguida, aquecer por duas horas em banho-maria. A temperatura final da solução deverá estar em torno de 90°C. Após o aquecimento, transferir o conteúdo dos frascos lavadores para o frasco Kjeldahl de 800 ml, lavar os frascos novamente com duas porções de 30 ml de água bidestilada e reunir as águas de lavagem no Kjeldahl. Concentrar em mantas de aquecimento até aproximadamente 2 ml, em capela de boa tiragem. Transferir quantitativamente o concentrado para uma proveta de 10 ml com tampa esmerilhada. Adicionar a este 2 ml de H_2SO_4 5 N, 0,5 ml de sulfato de hidrazina a 0,15% e 1 ml de molibdato de amônio a 2,5%. A proveta deverá ser invertida várias vezes após a adição de cada reagente. Ajustar o volume para 10 ml com água bidestilada. Fechar o tubo e colocar em banho-maria por 10 minutos. Após o resfriamento a temperatura ambiente, medir a intensidade de cor desenvolvida em espectrofotômetro a 730 nm, usando como branco a solução resultante de todo o procedimento anterior, sem a amostra. Deverá ser feito um branco dos reativos para verificar a possível presença de fosfatos. Calcular a quantidade de fósforo da amostra, usando a curva-padrão previamente estabelecida.

Curva-padrão — Fazer a curva-padrão pipetando alíquotas de solução-padrão correspondentes a 0,4; 0,8; 1,6; 2,4; 3,2; 4,0 e 4,8 μg de fósforo. Desenvolver a cor como descrito no procedimento acima e fazer a leitura. Para obter fosfina, multiplique o conteúdo do fósforo pelo fator 1,097 (fosfina % = $P \times 1,097$).

Recuperação — Colocar um comprimido de Gastoxin ou Phostoxin num frasco Erlenmeyer de 250 ml, com junta esmerilhada, e 50 ml de água. Destilar rapidamente através de uma conexão de vidro em U, tendo uma das pontas ligada ao Erlenmeyer, de maneira bem vedada, e a outra mergulhada em um frasco contendo 100 ml de dissulfeto de carbono. Após 2 horas, retirar o frasco

da conexão e preparar com a solução obtida uma solução de trabalho, diluindo, numa proporção de 1:200, com dissulfeto de carbono. (Estocar a solução-padrão mãe à temperatura de 0°C, e renovar a solução de trabalho a cada 5 dias).

Tomar uma alíquota de 3 ml da solução de trabalho e colocar em frasco Kjeldahl contendo 10 ml de água de bromo. Concentrar até 2 ml e determinar a concentração de fosfina, seguindo o procedimento já descrito. Transferir 300 g de uma amostra isenta de fosfina para o frasco de 3 bocas do conjunto de destilação, adicionar 300 ml de H₂SO₄, a

10%, e 3 ml da solução de trabalho. Seguir como descrito no procedimento e determinar a quantidade de fosfina recuperada.

RESULTADOS E CONCLUSÃO

A tabela da página seguinte mostra os níveis de resíduos de fosfina das análises efetuadas em 45 amostras. Observamos que em 10 amostras (22,2%) não foram encontrados resíduos de fosfina, em 22 amostras (48,8%) os resíduos estavam abaixo de 0,01 ppm e, em 13 amostras (28,8%), estavam acima de 0,01 ppm.

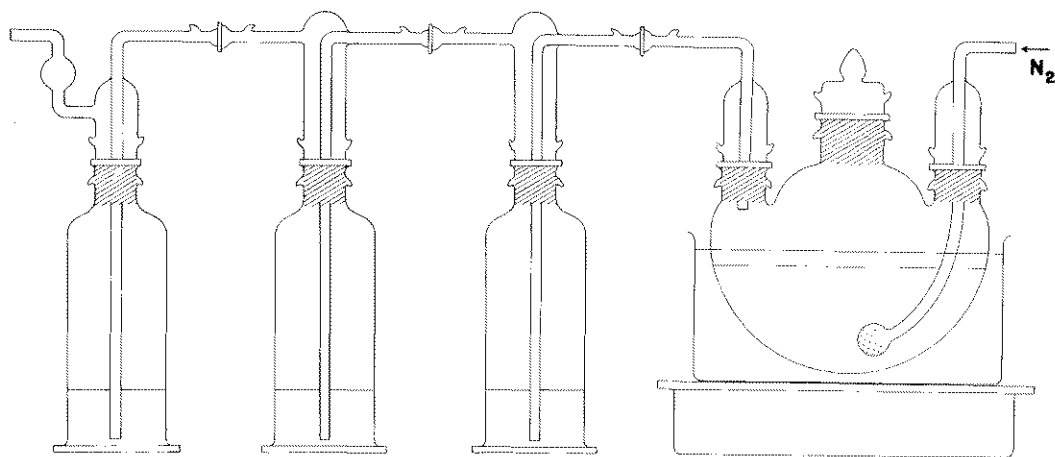


FIGURA -- Conjunto para destilação.

O valor mais significativo, de 5,5 ppm, foi encontrado em uma amostra de alho, o que está em desacordo com a legislação em vigor que não prevê resíduos de fosfina neste produto.

A presença de resíduos de fosfina em amostras de alho, banana e chocolate mostra que está havendo um uso inadequado deste fumigante. Mesmo nos produtos para os quais há permissão de uso (arroz, cacau), nem sempre os valores por nós encontrados estão dentro dos limites legais. Assim, a amostra n.º 3 (arroz) e a n.º 4 (cacau) apresentam

níveis muito altos, demonstrando falta de técnica na aplicação deste fumigante.

Nenhuma comparação dos resultados com os de trabalhos já realizados pôde ser feita, devido à falta de pesquisas similares publicadas.

Em virtude dos resultados encontrados, é evidente a necessidade de uma fiscalização atuante, constante e enérgica quanto à aplicação deste fumigante em produtos armazenados e, até mesmo, em produtos a eles relacionados.

TABELA

Níveis de fosfina encontrados em amostras analisadas em 1980

N.º	Amostra	mg/kg (ppm)	N.º	Amostra	mg/kg (ppm)
1	Arroz	0,05	24	Soja	< 0,01
2	Arroz	ND	25	Alho	0,33
3	Arroz	2,53	26	Alho	< 0,01
4	Arroz	ND	27	Alho	5,50
5	Arroz	ND	28	Alho	< 0,01
6	Arroz	ND	29	Amendoim	ND*
7	Arroz	ND	30	Amendoim	ND
8	Arroz	ND	31	Amendoim	0,06
9	Arroz	0,01	32	Chocolate	0,02
10	Arroz	< 0,01	33	Banana	< 0,01
11	Arroz	< 0,01	34	Banana	0,01
12	Arroz	< 0,01	35	Banana	< 0,01
13	Arroz	< 0,01	36	Banana	0,03
14	Arroz	< 0,01	37	Banana	ND
15	Arroz	< 0,01	38	Banana	0,01
16	Arroz	< 0,01	39	Banana	0,04
17	Arroz	< 0,01	40	Cacau	1,05
18	Arroz	< 0,01	41	Cacau	ND
19	Arroz	< 0,01	42	Cacau	0,01
20	Arroz	< 0,01	43	Cacau	< 0,01
21	Feijão	< 0,01	44	Cacau	< 0,01
22	Feijão	< 0,01	45	Cacau	< 0,01
23	Soja	< 0,01			

* ND = Não detectado.

RIALA6/585

BARRETTO, H.H.C.; INOMATA, O.N.K. & LARA, W.H. — Determination of phosphin residues in foods. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):149-153, 1984.

ABSTRACT: Phosphin is an agricultural spray which is much used in Brazil. Because of its toxicity at even low concentrations, 45 samples of various foods were examined by the spectrophotometric procedure. Residues were found in 77.8% of the specimens. Levels ranged from 0.01 to 5.5 mg/kg.

DESCRIPTORS: phosphin residues in foods, determination; food contaminants, phosphin residues.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Portaria SNVS n.º 10 de 8 de março de 1985, Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 14 mar. 1985. Seção I, p. 4591-4641. Atribui à DINAL a compilação da Relação de substâncias com ação tóxica sobre animais ou plantas...
2. ESTADOS UNIDOS. Department of Health, Education, and Welfare. Food and Drug Administration — *Pesticide analytical manual*. v. 2: *methods for individual pesticide residues*. Rockville, Md., 1968. p. 1-6. (Pesticide Reg. Sec. 120.225)
3. SAX, N.I. — *Dangerous properties of industrial materials*. 5th ed. New York, Van Nostrand/Reinhold, 1979.
4. WORTHING, C.R., ed. — *The pesticide manual, a world compendium*. 6th ed. London, British Crop Protection Council, 1979. p. 10.

Recebido para publicação em 28 de fevereiro de 1984.

PESQUISA DE ANTIBACTERIANOS NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO *

Carmo Elias Andrade MELLES **
Ilka Maria Landgraf LEE **
Augusto E. TAUNAY **

RIALA6/586

MELLES, C.E.A.; LEE, I.M.L. & TAUNAY, A.E. — Pesquisa de antibacterianos no líquido cefalorraquidiano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):155-159, 1984.

RESUMO: Tendo em vista que as dificuldades no diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas poderiam estar ligadas a agentes antibacterianos presentes no líquido cefalorraquidiano (LCR), foi desenvolvida metodologia fácil para evidenciar a sua presença nesse material. Em placa de ágar Mueller Hinton, semeada com *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P não produtora de penicilinase e sensível a grande número de antibacterianos, foi colocado um molde metálico com orifícios nos quais se aplicou o LCR que se difundia impedindo ou não o crescimento da bactéria-padrão. Das 641 amostras de LCR estudadas, em 38,53% o antibacteriano estava presente, e em 60,53% das amostras o agente etiológico foi caracterizado por exames bacteriológicos e/ou imunológicos. Os restantes 39,47% foram considerados de etiologia indeterminada. Pela análise estatística pode-se concluir que a presença de antibacteriano no LCR prejudica sobremaneira o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas. Considerando que a técnica empregada é de fácil execução, o seu uso rotineiro contribuirá para melhor interpretação dos resultados, principalmente daquelas amostras de LCR purulento em que não se visualiza ou identifica o agente bacteriano.

DESCRIPTORIOS: substâncias antibacterianas, pesquisa no líquido cefalorraquidiano; meningite, diagnóstico bacteriológico; líquido cefalorraquidiano, pesquisa de substâncias antibacterianas.

INTRODUÇÃO

As dificuldades existentes para evidenciar as bactérias responsáveis pelas meningites purulentas são reconhecidas de longa data¹¹. Com o advento da quimioterapia antibacteriana, começou-se a discutir se a presença dessas substâncias no líquido cefalorraquidiano seria a responsável por grande número de casos em que a doença é rotulada como meningite de causa indeterminada^{2, 4, 8}.

A informação sobre a administração ou não de antibacterianos, antes da retirada do LCR, raramente é confiável¹⁰. Investigando o assunto, observamos que a identificação dos casos tratados antes da colheita do LCR foi baseada em revisões de prontuários clínicos^{6, 13, 14, 15, 16, 18}. Na literatura que consultamos, só encontramos duas referências sobre a pesquisa de antibacterianos no LCR. Em

uma, os autores¹⁷ mostram a permeabilidade das meninges à penicilina nas diferentes fases da doença e, na outra, estudam a influência do quimioterápico no resultado do exame laboratorial em pequeno número de casos.

Visando esclarecer este problema, desenvolvemos metodologia simples, de fácil emprego até em laboratórios de recursos médios, que permite informar a eventual presença ou ausência de antibacterianos no LCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

No período de 2 anos, foram estudados 1.340 LCR de pacientes internados no Hospital "Emílio Ribas", São Paulo, com suspeita clínica de meningite, que foram enviados ao Instituto "Adolfo Lutz" para diagnóstico imunobacteriológico. Em todas as

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

amostras de LCR foi pesquisada a presença de antibacteriano; entretanto, só foi possível evidenciar alterações consideradas como indicativas de infecção bacteriana em 641 amostras. O critério adotado foi a positividade do exame bacteriológico ou a identificação de antígenos bacterianos demonstrados pela técnica da contraímunoeletroforese. Foram também incluídos os casos nos quais os exames acima citados foram negativos, mas estavam presentes alterações químico-citológicas, tais como o aumento do número de células por mm³ igual ou maior do de 1.000, ou então, a porcentagem de neutrófilos era de 60% ou mais, e a concentração de glicose e proteínas era 40 mg/ml ou menor, e 80 mg/ml ou maior, respectivamente. Qualquer variação marcante nas amostras de LCR, que sugerisse tratar-se de meningite bacteriana, foi incluída neste estudo.

Colheita e transporte do material

O LCR dos pacientes foi colhido por punção raquidiana lombar. Foi separado em duas alíquotas, uma para o exame bioquímico e citológico e outra encaminhada ao Instituto "Adolfo Lutz" para que se processassem provas de diagnóstico etiológico.

Recomendou-se que essa segunda alíquota tivesse pelo menos 2 ml; que fosse colhida em tubo de vidro esterilizado; conservada em estufa a 35-37°C, e enviada ao laboratório no menor espaço de tempo, se possível, entre 3 a 4 horas após a colheita.

Pesquisa de substâncias antibacterianas no líquido cefalorraquidiano

A metodologia para verificação da presença dos agentes antibacterianos no LCR foi baseada no método desenvolvido por GROVER & RANDAL⁹, em 1955. Na padronização da prova, esta técnica foi posteriormente modificada; empregou-se como bactéria-teste o *Staphylococcus aureus* ATCC Rockville MD 6538P, não produtor de penicilinase. Inicialmente, foi verificada a sensibilidade da cepa-padrão à ampicilina diluída em tampão fosfato, pH 6,0, em diferentes concentrações e padronizado o volume do LCR a ser aplicado em cada teste. De cada diluição da ampicilina foram utilizados os volumes de 0,2 e de 0,4 ml, feita em triplicata para cada volume. As concentrações do antibiótico nos volumes de 0,2 e 0,4 ml foram de 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 1,5 µg/ml, 2,0 µg/ml e 2,5 µg/ml e 3,0 µg/ml. Os mesmos volumes também foram utilizados para uma amostra de LCR proveniente de um paciente que era sabido já ter feito uso do antibacteriano antes da punção.

A fim de verificar se a sensibilidade do estafilococo usado como padrão, não sofrera mudança aos diferentes antibacterianos, empregamos para o teste a técnica descrita por BAUER et alii³. Utilizamos discos de procedência DIFCO impregnados com ampicilina (10 µg), penicilina (10 U), tetraciclina

(30 µg), eritromicina (15 µg), kanamicina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), estreptomina (10 µg), cefalosporina (30 µg), gentamicina (10 µg), novobiocina (30 µg), oxacilina (2 µg), sulfametoxazol-trimethopim (25 µg). Tal prova foi repetida algumas vezes durante a pesquisa, não tendo sido verificada nenhuma variação da sensibilidade da cepa-padrão em relação aos mesmos agentes antibacterianos.

Na pesquisa de antibacterianos no LCR, a cepa-padrão de *Staphylococcus aureus* foi semeada em placa contendo ágar Mueller Hinton, obedecendo à técnica de estrias a fim de se obterem colônias isoladas, da qual, 18-24 horas após a incubação a 35-37°C, tomamos 5 colônias separadas, que foram semeadas em tubo contendo quantidade conhecida de caldo comum. Do crescimento obtido após incubação, foi feita a diluição de 100 vezes em outro caldo de volume conhecido e semeada por inunção em outra placa contendo ágar Mueller Hinton, retirando-se o excesso da suspensão bacteriana com pipeta Pasteur. A preparação foi deixada em estufa a 37°C por 15 min e, a seguir, um "molde" de metal contendo 6 orifícios de 5 mm de diâmetro (figura 1), foi colocado sobre a superfície devidamente semeada.

Em cada um dos orifícios com pipeta volumétrica depositou-se 0,2 ml de LCR, de modo a se difundir lentamente no ágar. A prova foi feita o mais precocemente possível, evitando que o LCR permanecesse por longo tempo à temperatura ambiente, o que poderia ocasionar a degradação do quimioterápico. As placas assim preparadas foram incubadas a 35-37°C por um período de 18-24 horas. A leitura da prova foi feita retirando o molde metálico e medindo, quando presente, o halo de inibição do crescimento bacteriano com régua milimetrada, (figuras 2 e 3). Sempre que possível, esta prova era feita em duplicata. Foi considerado LCR com antibiótico ou quimioterápico presente aquele em que o halo de inibição do crescimento bacteriano foi de 10 mm de diâmetro ou maior, e antibiótico ausente, quando não houve inibição.

RESULTADO

As diferentes concentrações da ampicilina empregada na padronização do método, nos volumes de 0,2 ou 0,4 ml resultaram em média, em diâmetros do halo de inibição do crescimento bacteriano de 10; 12; 16; 21; 23; 23,3 e 24,2 mm segundo maior ou menor concentração. O mesmo procedimento, feito com um LCR cujo paciente sabidamente fez uso de quimioterápico, não demonstrou variação significativa quando se usou o volume de 0,2 ou 0,4 ml para aplicação do teste.

Aplicada a metodologia descrita na pesquisa de antibacterianos no LCR, observou-se que, de 641 amostras com características de meningite purulenta, em 38,53% foi detectado

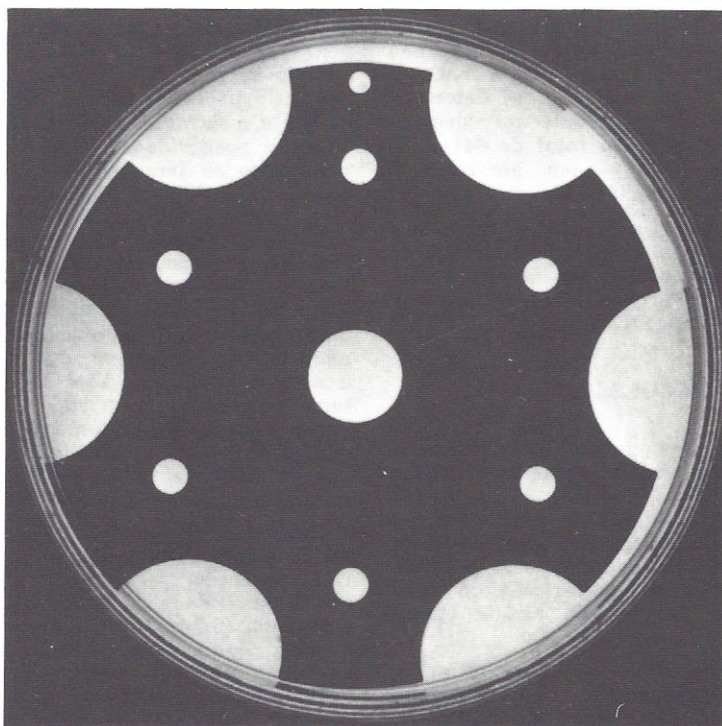
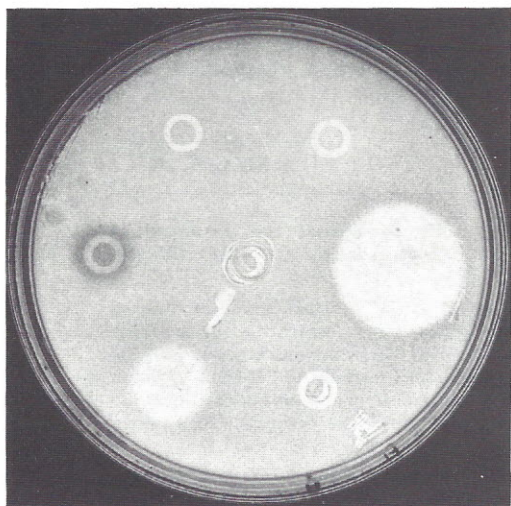


FIGURA 1 — Molde metálico utilizado para realização do teste.



FIGURAS 2 e 3 — Halos de inibição do crescimento bacteriano.

antibacteriano. Nestas, 51,01%, mesmo na presença de antibiótico, foi possível identificar o agente etiológico e, em 48,99% não foi possível determinar a etiologia bacteriana. Nas amostras em que não foi detectado antibiótico (61,47%), o agente foi identificado em 66,50% delas. Do total de 641 LCR examinados, em 60,53% das amostras o agente etiológico foi esclarecido.

Aplicando o teste unicaudal, dentro dos parâmetros escolhidos, verificou-se que quanto menor o diâmetro do halo de inibição bacteriana, maior foi a probabilidade de identificar o agente etiológico ($Z = -1,73 \quad = 0,05$).

DISCUSSÃO

Apesar de alguns autores^{4,5} preconizarem a pesquisa de substâncias antibacterianas em líquidos biológicos, somente FELDMAN⁷, 1977, pesquisou a presença de antibacteriano em número limitado de amostras de LCR de indivíduos em tratamento; sua intenção foi a de relacionar a interferência do antibacteriano no diagnóstico do agente etiológico.

A análise dos resultados por nós obtidos na pesquisa de antibacterianos no LCR mostrou que, das amostras examinadas, em 38,53% foi detectada a presença desses agentes. Na literatura consultada, os dados de alguns autores^{10, 12, 13}, relacionados ao assunto, têm como base somente levantamentos retrospectivos de prontuários de casos suspeitos de meningites. Por esta razão, na realidade não podem ser comparáveis aos nossos, quando procuramos o antibacteriano no LCR. Seria também interessante, entre outros, o conhecimento da via utilizada na aplicação do antibacteriano, a duração e a efetiva penetração deste agente através da barreira líquórica. Estas informações são de difícil obtenção, o que é comentado por HARTER¹⁰, quando afirma que dados sobre um tratamento prévio à internação nem sempre são corretos.

A avaliação estatística dos nossos resultados demonstra haver associação entre a presença de antibiótico no LCR e a identificação do agente etiológico, ou seja, a presença de antibiótico no LCR diminuiu significativamente a caracterização da bactéria. Entretanto, a positividade de um exame, seja bacteriológico ou imunológico, não exclui a presença de antibiótico no LCR, principalmente se a bactéria não for sensível ao mesmo. Tal fato foi constatado no presente trabalho; contudo, observou-se, também, que a concentração do agente antibacteriano (medida pelo diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano) foi significativamente menor naquelas amostras em que foi identificado o agente etiológico. Este resultado apresentado contradiz, em parte, a afirmativa de que a duração do tratamento preliminar não parece influenciar nos achados clínicos ou nos do LCR de forma a prejudicar o reconhecimento de uma meningite bacteriana¹⁰.

Considerando que a demonstração da presença de antibacteriano no LCR é prova de fácil execução, segundo a técnica descrita; que a quantidade de LCR utilizada na prova é pequena (0,2 ml), e que durante toda a pesquisa a cepa-padrão utilizada não apresentou variações em sua sensibilidade aos vários antibacterianos testados, é que recomendamos sua aplicação na rotina pois traria contribuição de valor na interpretação dos resultados do exame bacteriológico e imunológico de líquido cefalorraquidiano.

A razão de recomendarmos a pesquisa de antibacterianos no LCR é porque esta vem elucidar os inúmeros casos de LCR purulentos onde, pela bacterioscopia, se visualizam corpos bacterianos dos quais não há crescimento nos meios de cultura habituais, ou onde são vistas "imagens" semelhantes a bactérias, porém com morfologia tão alterada que não permite uma conclusão diagnóstica. Da mesma forma, estes corpos não são capazes de se multiplicar nos meios de cultura de escolha para o diagnóstico bacteriológico das meningites.

RIALA6/586

MELLES, C.E.A.; LEE, I.M.L. & TAUNAY, A.E. — Search for antibacterial substances in the spinal fluid of patients. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):155-159, 1984.

ABSTRACT: A simple procedure for detection of antibacterial substances in the spinal fluid was devised. The aim was disclosing to which extent antibacterial substances could interfere with the diagnosis of bacterial meningites. Müller-Hinton agar plates were inoculated with *Staphylococcus aureus* ATCC-6538 P which is a non-penicillinase-producing strain and is sensitive to many antibacterial substances. A perforated metal model received the spinal fluid, the occurrence or absence of growth being noted.

Out of 641 spinal fluid specimens, 38,53% showed presence of antibacterial substances. In 60,53% of the LCR studied, a bacteria was identified bacteriologically and/or immunologically.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AURELI, G.; CURCIO, L.; PALMINTERI, R. & RIGOLI, E. — Determinazione dell'attività antibiotica residua nel liquor. *Ann. Slavo*, 19:750-7, 1977.
2. BASTOS, C.O.; TAUNAY, A.E.; GALVÃO, P.A.A.; TIRIBA, A.C.; SARAIVA, P.A.; CASTRO, I.O. & LOMAR, A.V. — Meningitis: considerações sobre 15.607 casos internados no Hospital "Emílio Ribas" durante o quinquênio 1958-1972. Ocorrência etiológica e letalidade. *Rev. Assoc. méd. bras.*, 19:451-6, 1973.
3. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Path.*, 36:493-6, 1966.
4. CARVALHO, E.S.; NISKIER, H.; PESSÔA, G.V.A.; CARVALHO, L.H.F.R. & FAREHAT, K.C. — Incidência das meningites bacterianas. *Clin. Geral*, São Paulo, 12:23-5, 1978.
5. CHABBERT, Y.A. — Le laboratoire d'antibiothérapie dans les meningites purulentes. *Sem. Hôsp. Paris*, 43:239-42, 1967.
6. FEIGIN, R.D. & DODGE, P.R. — Bacterial meningitidis: newer concepts of pathophysiology and neurologic sequelae. *Pediatr. clin. N. Amer.*, 23:541-55, 1976.
7. FELDMAN, W.E. — Effect of prior antibiotic therapy on concentrations of bacteria in CSF. *Amer. J. Dis. Child.*, 132:672-44, 1977.
8. FINLAND, M. & BARNES, M.W. — Acute bacterial meningitis at Boston City Hospital during 12 selected years, 1935-1972. *J. infect. Dis.*, 136:400-15, 1977.
9. GROVE, D.C. & RANDAL, W.A. — Assay methods of antibiotic. A laboratory manual. New York, Medical Encyclopedia, c1955.
10. HARTER, D.H. — Preliminary antibiotic therapy in bacterial meningitis. *Arch. Neurol.*, 9:343-7, 1963.
11. HEDRICH, A.W. — The movements of epidemic meningitis, 1915-1930. *Public Health Rep.*, 46:2709-26, 1931.
12. HODGES, G.R. — Acute bacterial meningitis: an analysis of factors influencing prognosis. *Amer. J. med. Sci.*, 270:427-40, 1975.
13. JARVIS, C.W. & SAXENA, K.M. — Does prior antibiotic treatment hamper the diagnosis of acute bacterial meningitis? An analysis of a series of 135 childhood cases. *Clin. Pediatr.*, 11:201-4, 1972.
14. JONES, R.G. — Bacterial meningitis. Part I. Incidence and diagnosis. *S. Afr. med. J.*, 41:75-9, 1967.
15. LOPES, A.F.; FLEISCHER, G. & ZULIANI, A. — Meningite. Estudo retrospectivo dos casos internados na enfermaria do Departamento de Pediatria da FCMBB em 1973 e 1974. *J. Pediatr.*, 40:165-70, 1975.
16. MANDAL, B.K. — The dilemma of partially treated bacterial meningitis. *Scand. J. infect. Dis.*, 8:185-8, 1976.
17. SCATENA, L.; BARRACHINI, O.; ITO, I.Y.; ALMEIDA, S.A.R. — Meningite meningocócica. Níveis de ampicilina no líquido cefalorraquidiano e no soro. *J. Pediatr.*, 40:149-52, 1952.
18. UNDERMAN, A.E.; OVERTURF, G.O. & LEEDON, J.M. — Bacterial meningitis. *D.M.*, 24:1-63, 1978.

Recebido para publicação em 14 de março de 1984.



ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS DE COPROCULTURAS REALIZADAS DURANTE O PERÍODO 1977-1983 NA SEÇÃO DE BACTERIOLOGIA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ, SÃO PAULO *

Kinue IRINO **
Elena KANO **
Ângela Maria Girardi DIAS **
Chifumi Takeuchi CALZADA **
Suzel Nogueira NEME **
Sueli Aparecida FERNANDES **
Leda Kano NAKAHARA **
Gil Vital Álvares PESSÓA **

RIALA6/587

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKAHARA, L.K. & PESSÓA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatogênicas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-178, 1984.

RESUMO: Durante o período compreendido entre 1977 e 1983 foram realizadas 19.284 coproculturas na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz. A positividade foi de 31,85%, onde 15,89% pertencia à *Salmonella*, 12,13% à *Escherichia coli* enteropatogênica, enteroinvasiva e enterotoxigênica, e 3,83% à *Shigella*. Em 11,07% dos exames positivos foi isolada mais de uma enterobactéria patogênica em uma mesma amostra. *S. typhimurium* e *S. agona* foram os sorotipos mais freqüentes, correspondendo a 89,95% do total das salmonelas isoladas. Os sorogrupos de *E. coli* enteropatogênica de maior incidência foram 0111 e 0119. Entre as *E. coli* enteroinvasivas, os sorogrupos mais freqüentes foram 028ac, 0124 e 0136. Mais de 50% das cepas de *E. coli* enterotoxigênica pertencia ao sorogrupo 0128, e as cepas enterotoxigênicas portadoras dos fatores de colonização CFA/I ou CFA/II correspondiam a aproximadamente 35% do total. Assemelhando-se à incidência em outros países, mais de 95% das cepas de *Shigella* pertencia à *Shigella flexneri* e à *Shigella sonnei*. *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli* representam, ainda, os principais agentes etiológicos em nosso meio. Durante o período de um ano não foi isolada nenhuma cepa de *Yersinia enterocolitica*. O isolamento de *Campylobacter jejuni*, nos dois últimos anos de pesquisa realizada na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, e os resultados obtidos por diversos autores, em vários países, demonstram que sua freqüência tem aumentado de maneira significativa.

DESCRIPTORIOS: bactérias enteropatogênicas, isolamento em fezes; *Escherichia coli*; *Salmonella*; *Shigella*; *Yersinia enterocolitica*; *Campylobacter jejuni*; fezes, isolamento de bactérias enteropatogênicas.

INTRODUÇÃO

As gastroenterites constituem ainda uma das principais causas da mortalidade infantil nos países em desenvolvimento ⁴¹.

Na década de 1940, BRAY ¹ e outros pesquisadores demonstraram a importância da *E. coli* na etiologia infecciosa dos processos diarreicos do recém-nascido, época em que *Salmonella* e *Shigella* eram os agentes bacte-

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

rianos de reconhecido poder enteropatogênico. Atualmente, além dos clássicos agentes já conhecidos nas décadas anteriores, outros, como a *E. coli* enterotoxigênica, *E. coli* enteroinvasiva, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni* começam a ser incriminados como causadores desta infecção^{41, 42}.

A patogenicidade da *E. coli* enteropatogênica, enteroinvasiva e enterotoxigênica tem sido estudada por vários autores^{11, 13, 19, 26, 27}. Sabe-se que a *E. coli* enteroinvasiva age invadindo a mucosa intestinal de forma muito semelhante à da *Shigella*. Em relação à *E. coli* enterotoxigênica, os principais fatores de virulência são as enterotoxinas, causadoras de desequilíbrio hidrossalino, e os fatores de colonização^{6, 7, 39}. São conhecidos dois tipos de toxinas, a termostável e a termolábil, que são codificadas por plasmídios, podendo a cepa enteropatogênica produzir ao mesmo tempo as duas toxinas, ou apenas uma delas^{14, 21}. Quanto à *E. coli* enteropatogênica, apesar dos vários estudos realizados o mecanismo de sua patogenicidade ainda não está bem esclarecido.

A incidência de gastroenterite infantil está relacionada, via de regra, com os padrões sócio-econômicos de uma população¹⁶, ocorrendo predomínio de determinados sorogrupos ou sorotipos dos diferentes enteropatogênicos. A semelhança do que ocorre em outros países, isto também ocorre em nosso meio.

No presente trabalho são relatadas a frequência e a distribuição, nos vários grupos etários, de todas as bactérias enteropatogênicas isoladas no período de 1977-1983, responsáveis pelos casos suspeitos de gastroenterite de pacientes cujas fezes foram encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz para exames de comprovação do diagnóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

No período compreendido entre 1977-1983, na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, foram realizadas 19.284 coproculturas de pacientes internados em hospitais infantis e de moléstias infecciosas, ou atendidos em centros de saúde do município de São Paulo.

Para o isolamento de *E. coli* enteropatogênica, *Shigella* e *Salmonella* foi utilizada a metodologia já descrita por PESSÓA *et alii*^{23, 24}.

A pesquisa sistemática para o isolamento de *Y. enterocolitica*, iniciada em 1983, foi feita através do exame de placas de ágar MacConkey, reincubadas em estufa a 29°C, por 18-24 horas. Estas placas haviam sido

anteriormente semeadas e incubadas em estufa a 37°C, por 18-24 horas⁴⁰ para o isolamento de *E. coli* patogênica, *Shigella* e *Salmonella*. Após o diagnóstico presuntivo, todas as enterobactérias supostamente patogênicas foram submetidas às provas bioquímicas de confirmação do gênero, determinação da espécie e do biotipo^{5, 30} seguindo a metodologia já descrita²³.

As enterobactérias patogênicas com identificação bioquímica completa foram submetidas a identificação sorológica para a determinação dos seus sorogrupos e sorotipos.

A determinação dos sorotipos de *Salmonella* e *Shigella* foi realizada seguindo a metodologia já descrita^{21, 23}.

A identificação sorológica de *E. coli* enteropatogênica foi feita através de testes de aglutinação em placas de vidro, utilizando quatro soros polivalentes somáticos, cuja composição é a que segue:

Soro polivalente I	{	026 055 0127
Soro polivalente II	{	086 0111 0128
Soro polivalente III	{	0119 0125 0126
Soro polivalente IV	{	0114 0142 0158

Para a identificação dos sorogrupos de *E. coli* enteropatogênica, foram utilizados soros específicos, componentes do soro polivalente que apresentou uma aglutinação rápida e total na amostra em estudo. A confirmação do sorogrupo foi feita pela técnica de aglutinação lenta. Em tubos contendo diluições crescentes dos soros somáticos específicos foi colocado antígeno que consistia da suspensão bacteriana em solução fisiológica, previamente fervida durante uma hora, em banho-maria a 100°C. Após um período de incubação de 24 horas, em banho-maria, a 48°C, o diagnóstico era confirmado, se a amostra em estudo apresentasse um título aglutinante próximo ao da cepa-padrão homóloga⁹.

As amostras de *E. coli* não descarboxiladoras da lisina^{15, 30}, suspeitas de serem ente-

roinvasivas, foram submetidas primeiro à aglutinação com soro polivalente somático^{22,30} e, a seguir, com os soros específicos: 028ac, 029, 0112ac, 0124, 0136, 0143, 0144, 0152, 0164 e 0167. A confirmação dos sorogrupos foi feita segundo a metodologia já descrita para *E. coli* enteropatogênica. Paralelamente à identificação sorológica, foi realizado o teste de SERENY²⁸ para a verificação da capacidade invasora da amostra.

A pesquisa de *E. coli* enterotoxigênica, iniciada em 1981, foi feita através do teste de Dean⁴ para a detecção da toxina termolábil metanol solúvel (STa)², com soros específicos para a determinação dos fatores de colonização CFA/I e CFA/II.

Para o isolamento de *Campylobacter sp.* foram utilizadas placas com ágar-sangue ao qual se adicionou uma mistura de antibióticos³². A incubação das placas semeadas foi feita em estufa a 37°C, por 48 horas, em condições de microaerofilia¹⁸. A pesquisa de *Campylobacter sp.* foi iniciada em 1983.

A identificação de *Campylobacter sp.* foi realizada segundo o método de Skirrow³², onde testes bioquímicos, de sensibilidade aos agentes antimicrobianos, e teste de crescimento em diferentes temperaturas foram utilizados para a diferenciação das espécies.

RESULTADOS

As percentagens de positividade das coproculturas realizadas durante o período de 1977-1983, e os correspondentes às enterobactérias patogênicas isoladas durante este período estão relacionados na tabela 1.

A relação dos sorotipos de *Salmonella* e de *Shigella*, e dos sorogrupos de *E. coli* enteropatogênica encontra-se nas tabelas 2, 3 e 4.

Nas tabelas 5, 6 e 7 temos a distribuição dos sorotipos de *Salmonella* e de *Shigella*, e dos sorogrupos de *E. coli* enteropatogênica, nas diferentes faixas etárias.

A frequência e a distribuição, por faixa etária, dos sorogrupos de *E. coli* enteroinvasiva e *E. coli* enterotoxigênica estão nas tabelas 8 e 9.

As associações de enterobactérias patogênicas, isoladas em 1983 de casos de infecções mistas, e a idade dos pacientes, estão na tabela 10.

Na figura da página 175 temos a percentagem anual de positividade de *E. coli* enteropatogênica, enteroinvasiva, enterotoxigênica, de *Shigella* e de *Salmonella*, relativo aos

casos positivos dos exames realizados no período de 1977-1983.

DISCUSSÃO

Analisando a tabela 1, verificamos que as percentagens anuais de positividade das coproculturas, realizadas no período de 1977-1983, variaram de 18,45 a 38,65%, quando referentes a *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli*, patogênica.

Verificamos que *Salmonella* e *E. coli* patogênica contribuíram respectivamente com índices de até 19,83 e 16,15% das percentagens anuais de positividade das coproculturas, sendo que o mais elevado obtido para *Shigella* foi de 4,47%.

Em relação à *E. coli* enteropatogênica, verificamos pela análise da tabela 4 que os sorogrupos 0111 e 0119 foram os mais frequentes, representando 62,53% em todas as cepas isoladas no período de 1977-1983. Observamos que *E. coli* 0119 tornou-se o sorogrupo prevalente em 1982 e que, a partir de 1977 já aparecia como o segundo sorogrupo, sendo que durante o período 1970-1976 foi o terceiro sorogrupo mais frequentemente isolado no nosso meio, segundo PESSOA *et alii*²¹.

A participação de *E. coli* enteroinvasiva nos processos diarreicos permaneceu relativamente baixa. Assim, analisando a tabela 1, verificamos que o seu índice mais elevado, referente a percentagem anual de positividade das coproculturas, foi de apenas 0,95%.

Entre os 10 sorogrupos conhecidos de *E. coli* enteroinvasiva foram identificados 8, perfazendo um total de 85,92% das cepas isoladas, e 14,08% restante não pertencia a nenhum destes sorogrupos (tabela 8).

Foram estudadas 100 cepas de *E. coli* enterotoxigênica produtoras da toxina STa, onde 58% pertencia ao sorogrupo 0128, 2% ao 063, e 40% a sorogrupos ainda não determinados (tabela 9). Cepas de *E. coli* enterotoxigênica, que produziam fatores de colonização CFA/I ou CFA/II, corresponderam a 35% das amostras, o que está de acordo com os dados de THOMAS *et alii*³⁹.

Segundo os relatos da Organização Mundial da Saúde, os sorogrupos de *Shigella* predominantes em diferentes países são *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei*⁴¹. Da mesma maneira, observamos que 95,13% de todas as cepas isoladas pertenciam à *Shigella flexneri* (66,04%) e à *Shigella sonnei* (29,09%), sendo *Shigella flexneri* 2 e *Shigella sonnei* os sorotipos prevalentes em nosso meio (tabela 3).

Em relação à *Salmonella*, um dos principais agentes da gastroenterite, foram identificadas neste septênio 3.064 cepas pertencentes a 37 sorotipos.

S. typhimurium permanece como o sorotipo mais freqüente, seguido de *S. agona*, estando de acordo com os dados obtidos por CALZADA *et alii*³, quando relatam a ascensão de *S. agona* e o predomínio de *S. typhimurium* em diferentes materiais de origem humana, no período compreendido entre 1977-1982. Neste trabalho, 89,95% das cepas de *Salmonella* pertenciam aos sorotipos *S. typhimurium* (68,08%) e *S. agona* (21,87%) (tabela 2).

Trabalho realizado por PESSÓA *et alii*²⁰ mostra que aproximadamente 80% das cepas de *S. typhimurium*, isoladas de fezes no período de 1977-1982, hidrolizava o ONPG (orto-nitrofenil- β -D-piranosídeo), podendo ser consideradas como fermentadoras tardias da lactose, pois o seu comportamento era de não-fermentadoras deste carboidrato nos meios de isolamento.

Já com relação às cepas de *S. typhimurium*, isoladas em 1983, verificamos que cerca de 90% delas são capazes de fermentar a lactose entre o 3.^o e o 8.^o dia de incubação, demonstrando que a variante fermentadora tardia da lactose de *S. typhimurium* continua a predominar.

Quando foi isolada mais de uma enterobactéria patogênica de uma mesma amostra, a associação mais freqüente foi de *S. typhimurium* mais *E. coli* 0111 (tabela 10). Este achado, cuja incidência maior está na faixa etária de 0-6 meses, corresponde a 11,07% (28 associações) dos exames positivos realizados em 1983, assemelhando-se aos resultados relativos ao sextênio 1977-1982, onde a incidência das infecções múltiplas foi de 10,32% (PESSÓA *et alii*²²).

Embora as gastroenterites por *Yersinia enterocolitica* sejam freqüentemente relatadas em diversos países⁴¹, em nosso meio o seu isolamento tem-se constituído em eventos muito raros^{9, 17, 25, 29, 33}. Em Belém do Pará, LOUREIRO *et alii*¹⁷, analisando a prevalência de enteropatógenos em 261 crianças com diarreia aguda, encontraram apenas uma cepa de *Yersinia enterocolitica*¹⁷. Em pesquisa realizada em São Paulo por SILVA²⁹ quando examinou 524 amostras de fezes, não

foi isolada nenhuma cepa desta enterobactéria.

Devido às dificuldades no emprego de meios seletivos e ao longo período exigido pelo crio-enriquecimento a 4°C, a tentativa do isolamento de *Yersinia enterocolitica* foi feita somente por semeadura direta, não tendo sido isolada nenhuma cepa.

Com relação à *Campylobacter*, diferentes autores^{10, 43} têm relatado que a incidência varia de 5 a 14% nos indivíduos com diarreia, e é menos de 1% em portadores assintomáticos. Em São Paulo, FERNANDEZ⁸ obteve uma percentagem de isolamento de 7,4% de casos diarreicos, 6,9% de casos normais, e 11,9% de casos com diarreia crônica. Em 1983, no Instituto Adolfo Lutz, somente 3% das coproculturas realizadas foram positivas para *Campylobacter jejuni*, correspondendo a aproximadamente 10% dos exames positivos para bactérias enteropatogênicas.

Dados anteriores obtidos em laboratório mostram que o problema das enterobactérias patogênicas vem sendo abordado desde 1951 até a presente data^{15, 21, 22, 23, 34, 35, 36, 37}. Comparando os resultados destes diferentes períodos^{20, 21, 23}, torna-se evidente que houve uma modificação na freqüência das diferentes enterobactérias patogênicas e de seus sorogrupos ou sorotipos, como também com relação à faixa etária. É importante ressaltar o enorme problema representado pela *S. typhimurium* que aparece como o enteropatógeno mais freqüente nos últimos anos, em todas as faixas etárias, fato este já assinalado em trabalhos anteriores neste Instituto^{20, 21, 22}.

Quanto às variações na incidência dos sorogrupos ou sorotipos de enterobactérias, cabe assinalar que com relação à *Shigella* verificou-se uma sensível mudança, pois esta bactéria, antes bastante freqüente no nosso meio (TAUNAY *et alii*^{34, 38}), deixou de ser o principal agente das gastroenterites.

Estes dados mostram que trabalhos desta natureza são de interesse para avaliar a situação epidemiológica das gastroenterites causadas por bactérias patogênicas em nosso meio e, eventualmente, permitir medidas profiláticas, no época em que já se estuda a possibilidade de utilizar a vacinação na prevenção destas infecções.

TABELA 1

Número e percentagem anual de positividade de coproculturas realizadas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, no septênio 1977-1983, e enterobactérias isoladas

Coproculturas realizadas				Enterobactérias patogênicas									
Ano	N.º	Positivas		<i>E. coli</i> enteropatogênica		<i>E. coli</i> enteroinvasiva		<i>E. coli</i> enterotoxigênica		<i>Shigella</i> sp.		<i>Salmonella</i> sp.	
		N.º	%	N.º de cepas	%	N.º de cepas	%	N.º de cepas	%	N.º de cepas	%	N.º de cepas	%
1977	5.246	1.870	35,65	658	12,54	4	0,08	25	0,48	197	3,76	986	18,80
1978	3.507	1.038	29,60	374	10,66	3	0,09	15	0,43	151	4,31	495	14,11
1979	2.341	891	38,06	361	15,42	11	0,47	6	0,26	99	4,23	414	17,68
1980	2.794	1.080	38,65	366	13,10	25	0,89	10	0,36	125	4,47	554	19,83
1981	2.681	751	28,00	214	7,98	13	0,48	13	0,48	107	3,99	404	15,07
1982	1.344	258	19,20	90	6,70	2	0,15	12	0,89	32	2,38	122	9,08
1983	1.371	253	18,45	104	7,58	13	0,95	19	1,39	28	2,04	89	6,49
Total e percentagem	19.284	6.141	31,85	2.167	11,24	71	0,37	100	0,52	739	3,83	3.064	15,89

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CALZADA, C.T.; NEMÉ, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKA-HARA, L.K. & PESSOA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatogênicas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*; 44(2):161-178, 1984.

TABELA 2

Distribuição anual e percentagem dos principais sorotipos de *Salmonella* isolados de coproculturas realizadas no período de 1977-1983 no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

Sorotipos	1977		1978		1979		1980		1981		1982		1983		Total	
	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%
<i>S. typhimurium</i>	853	86,51	403	81,41	235	56,76	271	48,92	203	50,25	76	62,30	45	50,56	2.036	68,08
<i>S. agona</i>	55	5,58	41	8,28	133	32,12	244	44,05	155	38,37	19	15,57	23	25,84	670	21,87
<i>S. infantis</i>	13	1,32	9	1,82	6	1,45	3	0,54	10	2,47	8	6,56	9	10,11	58	1,89
<i>S. typhi</i>	13	1,32	4	0,81	14	3,38	7	1,26	6	1,49	1	0,82	—	0,00	45	1,47
<i>S. anatum</i>	19	1,93	11	2,22	1	0,24	1	0,18	—	0,00	—	0,00	—	0,00	32	1,05
<i>S. derby</i>	—	0,00	3	0,61	8	1,93	17	3,07	1	0,25	—	0,00	—	0,00	29	0,95
<i>S. I 4,12: — : —</i>	3	0,30	—	0,00	1	0,24	2	0,36	13	3,22	1	0,82	1	1,12	21	0,69
<i>S. panama</i>	1	0,10	6	1,21	2	0,49	1	0,18	3	0,74	1	0,82	—	0,00	14	0,46
<i>S. newport</i>	5	0,51	—	0,00	2	0,49	3	0,54	2	0,49	—	0,00	1	1,12	13	0,42
Outros sorotipos	24	2,43	18	3,64	12	2,90	5	0,90	11	2,72	16	13,11	10	11,25	96	3,13
Total e percentagem	986	100,00	495	100,00	414	100,00	554	100,00	404	100,00	122	100,00	89	100,00	3.064	100,00

(—) = Sorotipos não encontrados.

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKA-HARA, I.R. & PESSOA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatógenicas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-178, 1984.

TABELA 3

Número e percentagem anual dos sorotipos de *Shigella* isolados no período 1977-1983
no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

Sorotipos	1977		1978		1979		1980		1981		1982		1983		Total	
	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%
<i>Shigella dysenteriae</i> 2	15	7,61	6	3,97	4	4,04	1	0,80	2	1,87	—	0,00	—	0,00	28	3,79
<i>Shigella dysenteriae</i> 9	1	0,51	—	0,00	—	0,00	—	0,00	—	0,00	—	0,00	—	0,00	1	0,13
<i>Shigella flexneri</i> 1	21	10,66	12	7,95	1	1,01	1	0,80	9	8,41	1	3,13	—	0,00	45	6,09
<i>Shigella flexneri</i> 2	66	33,50	68	45,03	20	20,20	26	20,80	23	21,50	11	34,37	10	35,71	224	30,31
<i>Shigella flexneri</i> 3	25	12,69	11	7,29	14	14,14	30	24,00	12	11,22	2	6,25	1	3,57	95	12,86
<i>Shigella flexneri</i> 4	15	7,61	2	1,32	15	15,15	16	12,80	9	8,41	6	18,75	3	10,72	66	8,93
<i>Shigella flexneri</i> 5	1	0,51	—	0,00	—	0,00	2	1,60	—	0,00	—	0,00	—	0,00	3	0,41
<i>Shigella flexneri</i> 6	9	4,57	16	10,60	12	12,12	10	8,00	5	4,67	1	3,13	2	7,14	55	7,44
<i>Shigella boydii</i> 5	1	0,51	—	0,00	2	2,02	—	0,00	—	0,00	—	0,00	—	0,00	3	0,41
<i>Shigella boydii</i> 9	—	0,00	—	0,00	—	0,00	1	0,80	—	0,00	—	0,00	—	0,00	1	0,13
<i>Shigella boydii</i> 10	3	1,52	—	0,00	—	0,00	—	0,00	—	0,00	—	0,00	—	0,00	3	0,41
<i>Shigella sonnei</i>	40	20,31	36	23,84	31	31,32	38	30,40	47	43,92	11	34,37	12	42,86	215	29,09
Total e percentagem	197	100,00	151	100,00	99	100,00	125	100,00	107	100,00	32	100,00	28	100,00	739	100,00

(—) = Sorotipos não encontrados.

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CAIZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKA-HARA, L.K. & FESSOA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatógenas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-178, 1984.

TABELA 4

Número e percentagem dos sorogrupos de *E. coli* enteropatogênica isolados de coproculturas no período 1977-1983, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

Sorogrupos	1977		1978		1979		1980		1981		1982		1983		Total	
	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%	N.º cepas	%
<i>E. coli</i> 0111	296	44,98	158	42,24	150	41,55	172	46,99	114	53,27	27	30,00	30	28,85	947	43,70
<i>E. coli</i> 0119	96	14,59	51	13,64	72	19,94	74	20,22	46	21,49	40	44,44	29	27,88	408	18,83
<i>E. coli</i> 086	74	11,25	62	16,58	43	11,91	36	9,84	23	10,75	4	4,44	4	3,85	246	11,35
<i>E. coli</i> 055	76	11,55	29	7,75	27	7,48	45	12,29	—	0,00	2	2,22	12	11,54	191	8,81
<i>E. coli</i> 0125	40	6,08	30	8,02	12	3,32	8	2,19	8	3,74	2	2,22	10	9,61	110	5,08
<i>E. coli</i> 0128	33	5,01	19	5,08	22	6,10	10	2,73	—	0,00	3	3,34	4	3,85	91	4,20
<i>E. coli</i> 026	14	2,13	12	3,21	22	6,10	7	1,91	12	5,61	5	5,56	6	5,77	78	3,60
<i>E. coli</i> 0127	14	2,13	12	3,21	9	2,49	8	2,19	6	2,80	6	6,67	7	6,73	62	2,86
<i>E. coli</i> 0126	15	2,28	1	0,27	4	1,11	6	1,64	5	2,34	1	1,11	—	0,00	32	1,48
<i>E. coli</i> 0142	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	(...)	2	1,92	2	0,09
Total e percentagem	658	100,00	374	100,00	361	100,00	366	100,00	214	100,00	90	100,00	104	100,00	2.167	100,00

(...) = Não pesquisada.

(—) = Sorotipos não encontrados.

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKA-HARA, L.K. & PESSÓA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatogênicas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-178, 1984.

TABELA 5

Distribuição por faixa etária de sorotipos de Salmonella isolados de coproculturas no período 1977-1983, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

Faixa etária Sorotipo	Faixa etária											SI*	Total	Porcentagem
	0 - 3 meses	3 - 6 meses	6 - 12 meses	1 - 5 anos	5 - 10 anos	10 - 15 anos	15 - 20 anos	20 - 30 anos	30 - 40 anos	> 40 anos				
<i>S. typhimurium</i>	617	684	422	187	18	6	11	18	5	9	109	2.086	68,08	
<i>S. agona</i>	194	251	134	46	2	—	2	6	1	3	31	670	21,87	
<i>S. infantis</i>	7	14	12	12	—	—	—	4	1	3	5	58	1,89	
<i>S. typhi</i>	1	—	2	5	9	6	3	3	9	6	1	45	1,47	
<i>S. anatum</i>	6	1	4	3	—	2	1	2	5	2	6	32	1,05	
<i>S. derby</i>	15	6	2	4	—	1	—	—	1	—	—	29	0,95	
<i>S. I 4,12: — : —</i>	5	12	2	1	1	—	—	—	—	—	—	21	0,69	
<i>S. panama</i>	—	—	4	2	1	1	—	3	1	—	—	14	0,46	
<i>S. newport</i>	2	2	5	2	—	—	—	1	—	—	1	13	0,43	
<i>S. minnesota</i>	3	3	1	1	—	—	—	—	—	1	—	9	0,30	
<i>S. bredeney</i>	—	2	1	1	1	—	—	1	—	1	1	8	0,26	
<i>S. ingauda</i>	—	—	1	—	1	—	—	1	1	2	1	8	0,26	
<i>S. I 4,5,12: i : —</i>	—	—	3	—	—	—	—	—	1	2	—	6	0,20	
<i>S. dublin</i>	3	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	5	0,17	
<i>S. I 6,7: — : —</i>	—	—	1	—	—	—	—	—	2	—	1	4	0,13	
<i>S. oranienburg</i>	—	1	—	—	2	—	—	—	—	—	—	4	0,13	
<i>S. I 1,4,12: i : —</i>	2	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	4	0,13	
<i>S. muenchen</i>	—	—	1	—	—	1	—	1	—	—	—	3	0,10	
<i>S. enteritidis</i>	—	—	—	2	1	—	—	—	—	—	—	3	0,10	
<i>S. bovismorbificans</i>	1	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	3	0,10	
<i>S. saintpaul</i>	—	1	2	—	—	—	—	—	—	—	—	3	0,10	
<i>S. oslo</i>	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	2	0,07	
<i>S. infantis 014+</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	0,07	
<i>S. litchfield</i>	—	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	2	0,07	
<i>S. reading</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0,03	
<i>S. poona</i>	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0,03	
<i>S. I 9,12: — : —</i>	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	0,03	
<i>S. cerro</i>	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	0,03	
<i>S. coeln</i>	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0,03	
<i>S. newington</i>	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1	0,03	
<i>S. makino</i>	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1	0,03	
<i>S. III 59: — : —</i>	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0,03	
<i>S. livingstone</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0,03	
<i>S. madaba</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	0,03	
<i>S. san-diego</i>	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	0,03	
<i>S. heidelberg</i>	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	1	0,03	
<i>S. thompson</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0,03	
<i>S. glostrup</i>	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1	0,03	
<i>S. I 6,8: — : —</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0,03	
<i>S. miami</i>	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0,03	
<i>S. I 9,12: — : 1,5</i>	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	0,03	
<i>S. I 4,12: b : —</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	0,03	
<i>S. I 6,7: — : 1,5</i>	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0,03	
<i>S. brandenburg</i>	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	0,03	
<i>S. II sofia</i>	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1	0,03	
<i>S. london</i>	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0,03	
<i>S. senftenberg</i>	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0,03	
<i>Salmonella sp. rugosa</i>	2	3	1	1	—	—	—	—	—	—	—	7	0,23	
Total	861	984	602	274	39	19	19	45	28	30	163	3.064	100,00	
Porcentagem	28,10	32,12	19,65	8,94	1,27	0,62	0,62	1,47	0,91	0,98	5,32	100,00		

* SI = Sem idade determinada.

(—) = Sorotipos não encontrados.

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKA-HARA, L.K. & PESSOA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatógenicas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-178, 1984.

TABELA 6

Distribuição por faixa etária dos sorotipos de Shigella isolados de coproculturas no período 1977-1983, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

Sorotipo \ Faixa etária	0 — 3 meses	3 — 6 meses	6 — 12 meses	1 — 5 anos	5 — 10 anos	10 — 15 anos	15 — 20 anos	20 — 30 anos	30 — 40 anos	> 40 anos	SI*	Total	Porcentagem
A2	4	1	—	9	2	—	1	2	2	6	1	28	3,79
A9	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0,13
B1	2	9	9	8	6	—	1	4	3	1	2	45	6,09
B2	28	44	41	48	11	6	7	14	7	12	6	224	30,31
B3	15	24	16	18	3	1	2	9	2	3	2	95	12,86
B4	7	15	12	18	5	—	—	4	4	—	1	66	8,93
B5	—	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	3	0,41
B6	15	6	6	15	1	1	1	2	5	1	2	55	7,44
C5	—	—	—	1	2	—	—	—	—	—	—	3	0,41
C9	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1	0,13
C10	1	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	3	0,41
D	27	26	26	81	13	3	4	8	3	8	16	215	29,09
Total	100	127	112	199	43	11	16	43	27	31	30	739	100,00
Porcentagem	13,53	17,19	15,16	26,93	5,82	1,49	2,16	5,82	3,65	4,19	4,06	100,00	

*SI = Sem idade determinada.

(—) = Sorotipos não encontrados.

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKA-HARA, L.K. & PESSOA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatógenas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-178, 1984.

TABELA 7

Distribuição por faixa etária dos sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica isolados se coproculturas no período 1977-1983, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

Faixa etária Sorogrupo	0—3 meses	3—6 meses	6—12 meses	1—5 anos	5—10 anos	> 10 anos	SI*	Total	Perce- tagem
<i>E. coli</i> 0111	350	324	148	80	—	6	39	947	43,70
<i>E. coli</i> 0119	177	102	73	37	3	1	15	408	18,83
<i>E. coli</i> 086	108	67	33	30	2	2	4	246	11,35
<i>E. coli</i> 055	81	42	37	22	1	1	7	191	8,81
<i>E. coli</i> 0125	30	32	27	17	1	—	3	110	5,08
<i>E. coli</i> 0128	17	11	11	28	3	6	15	91	4,20
<i>E. coli</i> 026	14	16	24	16	6	—	2	78	3,60
<i>E. coli</i> 0127	9	8	15	20	2	2	6	62	2,86
<i>E. coli</i> 0126	2	7	7	10	1	4	1	32	1,48
<i>E. coli</i> 0142	—	—	—	—	2	—	—	2	0,09
Total	788	609	375	262	19	22	92	2.167	100,00
Percentagem	36,36	28,10	17,30	12,00	0,88	1,02	4,25	100,00	

*SI = Sem idade determinada.

(—) = Sorogrupos não encontrados.

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CAIZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKA-HARA, I.K. & PESSOA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatogênicas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-178, 1984.

TABELA 8

Distribuição por faixa etária dos sorogrupos de *E. coli* enteroinvasiva isolados de coproculturas no período 1977-1983, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

Faixa etária Sorogrupo	0—3 meses	3—6 meses	6—12 meses	1—5 anos	5—10 anos	10—15 anos	15—20 anos	20—30 anos	30—40 anos	> 40 anos	SI*	Total	Porcen- tagem
<i>E. coli</i> 028 ac	1	4	1	8	3	—	—	—	2	1	—	20	28,17
<i>E. coli</i> 0124	—	—	—	5	3	—	1	1	1	—	—	11	15,49
<i>E. coli</i> 0136	—	2	—	2	1	—	1	1	1	—	—	8	11,27
<i>E. coli</i> 0152	—	—	—	2	2	1	1	—	—	—	1	7	9,86
<i>E. coli</i> 029	—	3	—	2	—	—	—	—	—	1	—	6	8,45
<i>E. coli</i> 0143	—	—	—	2	1	—	1	1	—	—	—	5	7,04
<i>E. coli</i> 0144	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	2	2,82
<i>E. coli</i> 0167	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	2	2,82
<i>E. coli</i> enteroinvasiva**	1	—	—	1	3	1	2	1	—	1	—	10	14,08
Total	2	9	1	24	13	2	6	5	4	4	1	71	100,00
Porcentagem	2,82	12,68	1,41	33,80	18,31	2,82	8,45	7,04	5,63	5,63	1,41	100,00	

*SI = Sem idade determinada.

** = Sorogrupo não determinado.

(—) = Sorotipos não encontrados.

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CAIZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKA-HARA, L.K. & PESSOA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatógenas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-178, 1984.

TABELA 9

Distribuição por faixa etária dos sorogrupos de *E. coli* enteroinvasiva isolados de coproculturas no período 1977-1983, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

Faixa etária \ Sorogrupos	0 — 3 meses	3 — 6 meses	6 — 12 meses	1 — 5 anos	5 — 10 anos	10 — 15 anos	15 — 20 anos	20 — 30 anos	30 — 40 anos	> 40 anos	SI*	Total	Perce- tagem
<i>E. coli</i> 0128 ST+	24	16	9	4	2	—	—	—	—	—	3	58	58
<i>E. coli</i> 063 ST+	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2
<i>E. coli</i> **ST+	17	4	5	12	—	—	1	—	—	—	1	40	40
Total	42	21	14	16	2	—	1	—	—	—	4	100	100
Porcentagem	42	21	14	16	2	—	1	—	—	—	4	100	

* SI = Sem idade determinada.

** = Sorogrupo não determinado.

(—) = Sorogrupos não encontrados.

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, AM.G.; CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKA-
HARA, L.K. & PESSOA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatogênicas de coproculturas
realizadas durante o período 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São
Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-178, 1984.

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKAHARA, L.K. & PESSÓA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatogênicas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1988 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-178, 1984.

TABELA 10

Associações de enterobactérias patogênicas identificadas em casos de infecções mistas, durante o ano de 1988, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo^()*

Associações de enterobactérias			Idade dos pacientes
<i>S. typhimurium</i>	+	<i>E. coli</i> 0111 <i>E. coli</i> 086	1 mês
<i>S. typhimurium</i>	+	<i>E. coli</i> 0111	1 mês
<i>S. typhimurium</i>	+	<i>E. coli</i> 0111	17 dias
<i>S. typhimurium</i>	+	<i>E. coli</i> 0111	2 meses
<i>S. typhimurium</i>	+	<i>E. coli</i> 0111	4 meses
<i>S. typhimurium</i>	+	<i>E. coli</i> 0119	6 meses
<i>S. typhimurium</i>	+	<i>E. coli</i> 0119	1 mês
<i>S. typhimurium</i>	+	<i>E. coli</i> 0125	6 meses
<i>S. typhimurium</i>	+	<i>Shigella flexneri</i> 2	5 meses
<i>S. typhimurium</i>	+	<i>Shigella flexneri</i> 2	8 meses
<i>S. typhimurium</i>	+	<i>Shigella sonnei</i>	5 meses
<i>S. typhimurium</i>	+	<i>S. agona</i>	4 meses
<i>S. agona</i>	+	<i>E. coli</i> 0119	RN(****)
<i>S. agona</i>	+	<i>E. coli</i> ST+ (**)	3 meses
<i>S. infantis</i>	+	<i>E. coli</i> 0128 ST+	18 dias
<i>S. infantis</i>	+	<i>E. coli</i> 0119	3 meses
<i>S. infantis</i>	+	<i>E. coli</i> ST+	SI(*****)
<i>S. minnesota</i>	+	<i>E. coli</i> ST+	3 meses
<i>S. saintpaul</i>	+	<i>E. coli</i> 0127	5 meses
<i>S. inganda</i>	+	<i>Shigella flexneri</i> 4	7 anos
<i>Shigella sonnei</i>	+	<i>E. coli</i> ST+	2 anos
<i>Shigella flexneri</i> 4	+	<i>E. coli</i> 0128 ST— (***)	2 anos
<i>Shigella flexneri</i> 2	+	<i>E. coli</i> 0119	25 dias
<i>Shigella flexneri</i> 3	+	<i>E. coli</i> 0125	2 meses
<i>E. coli</i> 0111	+	<i>E. coli</i> 0119	12 dias
<i>E. coli</i> 055	+	<i>E. coli</i> 0125	16 dias
<i>E. coli</i> 0119	+	<i>E. coli</i> 026	6 meses
<i>E. coli</i> 028ac	+	<i>E. coli</i> 0124	1 ano

(*) As tabelas correspondentes à ocorrência de associações de infecções do período 1987-1982 estão publicadas em artigo anterior²².

(**) ST+ = Enterotoxina termoestável positiva.

(***) ST— = Enterotoxina termoestável negativa.

(****) RN = Recém-nascido.

(*****) SI = Sem idade determinada.

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKA-HARA, L.K. & PESSOA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatógenicas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-178, 1984.

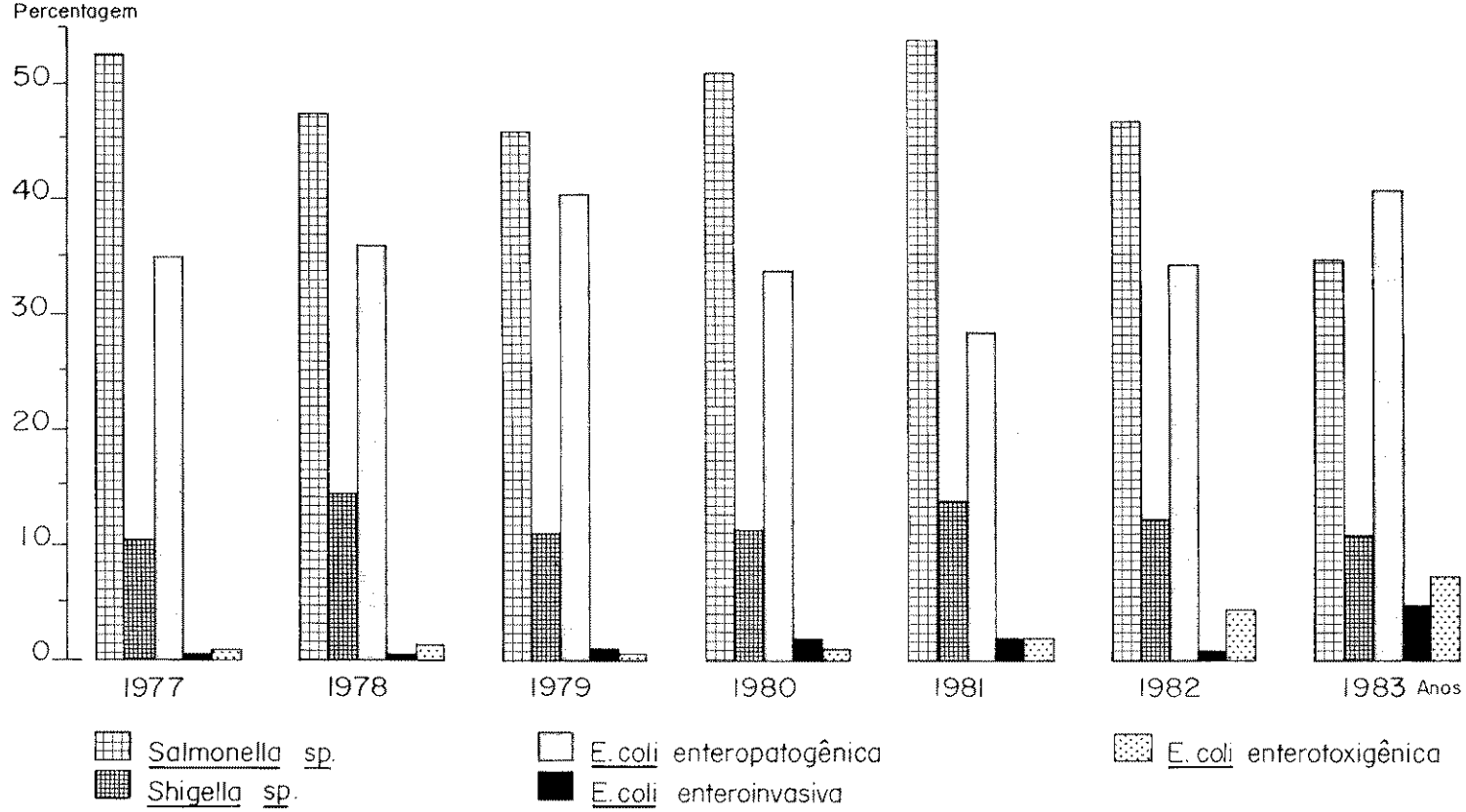


FIGURA — Porcentagem anual de cepas de *Salmonella*, *Shigella* sp. e *Escherichia coli* enteropatógena, enteroinvasiva e enterotoxigênica isoladas das amostras positivas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1983, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKAHARA, L.K. & PESSÓA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatogênicas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-178, 1984.

RIALA6/587

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKAHARA, L.K. & PESSÓA, G.V.A. — Isolation of enteropathogenic bacteria from feces collected between 1977 and 1983 in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-178, 1984.

ABSTRACT: A study is made of the 19,284 bacterial cultures of stools which were conducted at the Central Public Health Laboratory of the State of São Paulo, Brazil, between 1977 and 1983. The positive specimens amounted 31.85% and were composed of 15.89% containing *Salmonella* sp., 12.13% with the classic enteropathogenic, enteroinvasive, enterotoxigenic *Escherichia coli*, and 3.83% with *Shigella* sp. In 11.07% of the positive specimens, more than one enteropathogenic bacteria were isolated. Of the specimens yielding *Salmonella* sp., 89.95% corresponded to *S. typhimurium* or *S. agona*. The more frequent serotypes of the classic enteropathogenic *E. coli* were 0111 and 0119. Among the enteroinvasive *E. coli*, the most frequent serotypes were 028ac, 0124 and 0136. More than 50% of the enterotoxigenic *E. coli* belonged to serotype 0128 and about 35% of all toxigenic isolates had the colonization factor CFA/I or CFA/II. Similarly to what has been found in other countries, more than 95% of *Shigella* strains belonged to *S. flexneri* and *S. sonnei*. *Salmonella*, *Shigella* and *E. coli* are the most frequent agents of gastroenteritis in São Paulo. The longest interval without isolation of *Yersinia enterocolitica* was one year while *Campylobacter jejuni* was isolated in 1982 and 1983.

DESCRIPTORS: feces, content of enteropathogenic bacteria; enteropathogenic bacteria, isolation from feces; *Salmonella* sp.; *Escherichia coli*; *Shigella* sp.; *Yersinia enterocolitica*; *Campylobacter jejuni*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRAY, J. — Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. *J. Pathol. Bacteriol.*, 57:239-47, 1945.
2. BURGESS, M.N.; BYWATER, R.J.; COWLEY, C.M.; MULLAN, N.A. & NEWSOME, P.M. — Biological evaluation of a methanol-soluble heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.*, 21: 526-31, 1978.
3. CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; FERNANDES, S.A. & PESSÓA, G.V.A. — Sorotipos de *Salmonella* identificados no período de 1977-1983, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44: 1-18, 1984.
4. DEAN, A.G.; CHING, Y.C.; WILLIAMS, R.G. & HARDEN, L.B. — Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. infect. Dis.*, 125: 407-11, 1972.
5. EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. — *Identification of enterobacteriaceae*. 3rd ed. Minneapolis, Burgess, 1972. 362 p.
6. EVANS, D.G. & EVANS, D.J., Jr. — New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups 06 and 08. *Infect. Immun.*, 21: 638-47, 1978.
7. EVANS, D.G.; EVANS, D.J., Jr. & TJOA, W. — Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect. Immun.*, 18:330-7, 1977.
8. FERNANDEZ, H. — *Espécies termófilas de Campylobacter: aspectos bacteriológicos, epidemiológicos e patogênicos*. São Paulo, 1983. 144 p. [Tese — Escola Paulista de Medicina]
9. FONTES, C.F.; TOLEDO, M.R.F.; REIS, M.H.L.; MURAHOVSKI, J. & TRABULSI, L.R. — Isolamento de uma amostra de *Yersinia enterocolitica* das fezes de uma criança na cidade de São Paulo. *Rev. Microbiol.*, 9:167-8, 1978.
10. GLASS, R.I.; STOLL, B.J.; HUQ, M.I.; STRUELENS, M.J.; BLASER, M. & KIBRIYA, K.M. — Epidemiologic and clinical features of endemic *Campylobacter jejuni* infection in Bangladesh. *J. infect. Dis.*, 148:292-6, 1983.

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKAHARA, L.K. & PESSÓA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatogênicas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-178, 1984.

11. GORBACH, S.L.; KEAN, B.H.; EVANS, D.G.; EVANS, D.J., Jr. & BESSUDO, D. — Traveller's diarrhoea and toxigenic *Escherichia coli*. *New Engl. J. Med.*, 292: 933-5, 1975.
12. GROSS, R.J.; THOMAS, L.V.; CHEASTY, T.; DAY, N.P.; ROWE, B.; TOLEDO, M.R.F. & TRABULSI, L.R. — Enterotoxigenic and enteroinvasive *Escherichia coli* strains belonging to a new O group, 0167. *J. clin. Microbiol.*, 17:521-3, 1983.
13. GUERRANT, R.L.; MOORE, R.; KIRSCHENFELD, B. & SANDE, M.A. — Role of enterotoxigenic and invasive bacteria in acute diarrhoea of childhood. *New Engl. J. Med.*, 293:567-73, 1975.
14. GYLES, C.; SO, M. & FALKOW, S. — The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. *J. infect. Dis.*, 130:40-49, 1974.
15. KANO, E.; PEIXOTO, E.S.; GONÇALVES, L.M.; CALZADA, C.T. & PESSÓA, G.V.A. — Isolamento de *Escherichia coli* invasora, em São Paulo, no período de janeiro de 1978 a dezembro de 1980. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41:37-41, 1981.
16. LEVINE, M.M. — Conceptos tradicionales sobre diarrea aguda: viejos y nuevos agentes y agentes equivocados. *GEN*, Caracas, 36:9-11, 1982.
17. LOUREIRO, E.C.B.; LINS, Z.C.; LINHARES, A.C.; MONÇÃO, H.C.; GABBY, Y.B.; ARAÚJO, V.L. & SERRUYA, A.C. — Prevalência de bactérias enteropatogênicas e rotavírus associados a diarréia infantil em Belém, Pará. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 9.º, e CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 12.º, São Paulo, 1983. p. 135. [Resumo 107]
18. MAGALHÃES, M.; ANDRADE, M.A. & SILVA, G.P. — Simple and inexpensive method for culturing *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Rev. Microbiol.*, 13:124-5, 1982.
19. OGAWA, W.; NAKAMURA, A. & SAKAZAKI, R. — Pathogenic properties of "enteropathogenic" *Escherichia coli* from diarrhoeal children and adults. *Jpn. J. med. Sci. Biol.*, 21:333-49, 1968.
20. PESSÓA, G.V.A.; CALZADA, C.T.; IRINO, K.; NEME, S.N.; KANO, E.; DIAS, A.M.G. & BRANDILEONE, M.C.C. — *Salmonella typhimurium* fermentadora tardia da lactose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 43:89-95, 1983.
21. PESSÓA, G.V.A.; CALZADA, C.T.; PEIXOTO, E.S.; MELLES, C.E.A.; KANO, E.; RASKIN, M.; SIMONSEN, V. & IRINO, K. — Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970-76. III — Sorotipos de *Shigella* e de *Escherichia coli* da gastroenterite infantil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38:129-39, 1978.
22. PESSÓA, G.V.A.; IRINO, K.; CALZADA, C.T.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; NEME, S.N.; SIMONSEN, V. & VAZ, T.M.I. — Ocorrência de infecções entéricas múltiplas por enterobactérias patogênicas, no município de São Paulo, no sextênio 1977-1982. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 43: 97-103, 1983.
23. PESSÓA, G.V.A.; IRINO, K.; CALZADA, C.T.; MELLES, C.E.A. & KANO, E. — Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970-1976. I — Sorotipos de *Salmonella* isolados e identificados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38:87-105, 1978.
24. PESSÓA, G.V.A. & SILVA, E.A.M. — Milieu pour l'identification présumptive rapide des entérobactéries, des *Aeromonas* et des vibrions. *Ann. Microbiol.*, Paris, 125 A: 341-7, 1974.
25. PIZZOLITTO, A.C.; FALCÃO, D.P.; SHIMIZU, M.T.; GALVÃO, S.H.M. & GERALDINI, W. — The first isolation of human *Yersinia enterocolitica* in Brazil. Case report. *Contrib. Microbiol. Immunol.*, 5: 169-73, 1979.
26. SACK, R.B.; GORBACH, S.L.; BANWELL, J.G.; JACOBS, B.; CHATTERJEE, B.D. & MITRA, R.C. — Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *J. infect. Dis.*, 123:378-85, 1971.
27. SAKAZAKI, R.; TAMURA K. & SAITO, M. — Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with diarrhea in children and adults. *Jpn. J. med. Sci. Biol.*, 20:387-99, 1967.
28. SERENY, B. — Experimental *Shigella* keratoconjunctivitis. A preliminar report. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 2:293-6, 1955.
29. SILVA, L.A. — Pesquisa de *Yersinia enterocolitica* em fezes de diarréicos e não diarréicos no município de São Paulo. São Paulo, 1982. 72 p. [Dissertação de mestrado — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo]
30. SILVA, R.M.; TOLEDO, M.R.F. & TRABULSI, L.R. — Biochemical and cultural characteristics of *Escherichia coli*. *J. clin. Microbiol.*, 11:441-4, 1980.
31. SMITH, H.W. & HALLS, S. — Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J. Pathol. Bacteriol.*, 93:531-43, 1967.
32. SKIRROW, M.B. & BENJAMIN, J. — '1001' *Campylobacter*: cultural characteristics of intestinal campylobacters from man and animals. *J. Hyg. Camb.*, 85:427-42, 1980.
33. STUMPF, M.; RICCIARDI, I.D.; OLIVEIRA, N.; SABRA, A. & BERNHOEFT, M. — *Yersinia enterocolitica* as a cause of infantile diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. bras. Pesq. Med. Biol.*, 11: 383-4, 1978.

IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKAHARA, L.K. & PESSÓA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatogênicas de coproculturas realizadas durante o período 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):161-178, 1984.

34. TAUNAY, A.E. — Bacteriologia das shigeloses. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 11:49-102, 1951.
35. TAUNAY, A.E.; BICUDO, J.C.S.; CORRÊA, A. & PEIXOTO, E.S. — Estudo bacteriológico da diarreia do recém-nascido. *Hospital*, Rio de J., 49:625-34, 1956.
36. TAUNAY, A.E.; MARTINS, H.; TOPOROWSKI, J.; TOLEDO, L.A. & PEIXOTO, E.S. — Investigações laboratoriais sobre a enterite infantil por *E. coli* G.E.I. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 18:45-81, 1958.
37. TAUNAY, A.E.; NOVAES, J.R.C. & PESSÓA, G.V.A. — Infecções por enterobactérias no município de São Paulo. Provável disseminação por via aérea. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31:113-6, 1971.
38. TAUNAY, A.E.; PONTES, J.F.; PRATO, E. & PEIXOTO, E.S. — Shigeloses: comparação dos métodos de colheita das fezes no diagnóstico bacteriológico das enterocolites crônicas. Aglutininas e coproaglutininas na enterocolite crônica. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 16:37-61, 1956.
39. THOMAS, L.V.; CRAVIOTO, A.; SCOTLAND, S.M. & ROWE, B. — New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. *Infect. Immunol.*, 35:1119-24, 1982.
40. WEISSFELD, A.S. & SONNERWIRTH, A.C. — Rapid isolation of *Yersinia* sp. from feces. *J. clin. Microbiol.*, 15:508-10, 1982.
41. WHO SCIENTIFIC WORKING GROUP (ON EPIDEMIOLOGY AND ETIOLOGY OF THE CDD) — Enteric infections due to *Campylobacter*, *Yersinia*, *Salmonella*, and *Shigella*. *Bull. WHO*, 58:23-36, 1980.
42. WHO SCIENTIFIC WORKING GROUP (ON EPIDEMIOLOGY AND ETIOLOGY OF THE CDD) — *Escherichia coli* diarrhoea. *Bull. WHO*, 58:519-37, 1980.

Recebido para publicação em 3 de abril de 1984.

ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA ADENOVÍRUS TIPOS 1 A 7 EM HABITANTES DA CIDADE DE SÃO PAULO, BRASIL, EM 1982 *

Maria Akiko ISHIDA **
Shunji SAKAKIBARA ***
Yoko YOKOTA ***

RIALA6/588

ISHIDA, M.A.; SAKAKIBARA, S. & YOKOTA, Y. — Anticorpos neutralizantes para adenovírus tipos 1 a 7 em habitantes da cidade de São Paulo, Brasil, em 1982. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):179-183, 1984.

RESUMO: Foram pesquisados anticorpos neutralizantes para adenovírus tipos 1 a 7, em 180 soros de 180 indivíduos residentes na cidade de São Paulo, de diferentes grupos etários, colhidos em fevereiro de 1982. Os resultados mostraram que 53,3% dos doadores possuíam anticorpos para os tipos 1, 2, 3 e 5; 88,9% a 100% de indivíduos, com mais de 5 anos de idade, tinham anticorpos para adenovírus tipos 1 e 2. Quanto ao tipo 3 e 5, verificou-se elevação gradual, grupo a grupo, com percentagem um pouco menor que a dos tipos 1 e 2; porém, 71,9% a 92,8% dos indivíduos acima de 20 anos, possuíam anticorpos para os tipos 3 e 5. Em relação aos tipos 4 e 6, nas faixas etárias acima de 5 anos, a média foi de 50% e, para o tipo 7, aproximadamente de 20%. Foi verificado que 40% das crianças do grupo etário de 0 a 4 anos, não possuíam anticorpos para os 7 tipos de adenovírus estudados, e que 72,8% dos indivíduos acima de 10 anos possuíam anticorpos para 4-6 tipos diferentes de adenovírus.

DESCRITORES: adenovírus, infecção humana; anticorpos para adenovírus, teste de neutralização.

INTRODUÇÃO

Row *et alii*, em 1953, isolaram pela primeira vez o adenovírus, a partir de cultura de tecidos de adenóides humanas. São conhecidos mais de 35 adenovírus, antigenicamente distintos, de origem humana⁹.

Os adenovírus apresentam vários quadros clínicos^{3, 5, 9} e afetam o trato respiratório, as conjuntivas oculares, ou o trato gastrintestinal.

De 1960 a 1980, estudos realizados no Brasil², Estados Unidos^{7, 8, 15}, Japão^{6, 10, 11, 13} e Taiwan¹² mostraram que as taxas de anticorpos neutralizantes para diferentes tipos de adenovírus variam conforme a idade, população e área geográfica estudada.

O objetivo deste trabalho foi determinar anticorpos neutralizantes para 7 diferentes tipos de adenovírus, assim como estudar o comportamento imunológico de habitantes da cidade de São Paulo, em relação a estes adenovírus.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros humanos

Foram utilizados 180 soros de 180 indivíduos residentes na cidade de São Paulo, pertencentes a diferentes faixas etárias, escolhidos aleatoriamente dentre pessoas que procuraram o Instituto Adolfo Lutz para a realização de exames laboratoriais outros,

* Realizado no Instituto de Saúde Pública e Meio Ambiente, Província de Shiga, Japão. Apresentado no 57.º Congresso da Sociedade Japonesa de Doenças Infecciosas, Osaka, Japão, 1983.

** Da Seção de Vírus Respiratórios do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

*** Do Instituto de Saúde Pública e Meio Ambiente da Província de Shiga, Japão.

em fevereiro de 1982. As amostras foram colhidas na Seção de Colheita de Material deste Instituto e enviadas ao Instituto de Saúde Pública e Meio Ambiente da Província de Shiga, Japão, para serem estudadas.

TABELA

Distribuição das amostras de soro, segundo grupos etários

N.º de amostras	Grupos etários (anos)
15	0 — 4
11	5 — 9
25	10 — 19
28	20 — 29
26	30 — 39
25	40 — 49
32	50 — 59
18	≥ — 60
180	—

Culturas de células

Foram utilizadas culturas de células HeLa, cedidas pelo Dr. Tokuda, do Hospital Central de Kurashiki, Província de Okayama, Japão.

Meios de cultura

Foi utilizado o meio Eagle comercial (5900 NS), da Nissui*, na proporção de 0,94 g para 100 ml de água destilada, ao qual foi adicionado 1 g de glutamina. Como meio de crescimento das células em microplacas e em garrafinhas de 250 ml foi utilizado o meio Eagle ao qual foi adicionado 10% de soro fetal bovino. Como meio de manutenção das células em microplacas, foi utilizado o meio Eagle, suplementado com 1% de soro fetal bovino. No meio de manutenção em garrafinhas foram utilizados 2% de soro de vitelo.

Antígenos

Foram utilizados protótipos de adenovírus (ADV) tipos 1 a 7, gentilmente cedido pelo Dr. Takao Yoshii do Instituto Nacional de Saúde de Tóquio, Japão. Os protótipos de ADV usados foram: tipo 1, adenoid 71; tipo 2, adenoid 6; tipo 3, G.B.; tipo 4, R 167; tipo 5, adenoid 75; tipo 6, tonsil 99 e tipo 7, Gomen⁹.

Titulação

O antígeno foi produzido em garrafinhas de células HeLa. A titulação do antígeno foi realizada nestas mesmas células, em microplacas com fundo chato. Foram feitas diluições em série a partir de 1:4 até 1:8.192. Foi considerado como 1 U de vírus em 0,050 ml a última diluição que, no 3.º dia demonstrou efeito citopático (+++ ou ++++ plus). O título utilizado na reação foi de 2 unidades de vírus/0,025 ml.

Reação de neutralização

A reação de neutralização foi realizada em microplacas de transferência em U e acopladas em microplacas de fundo chato¹.

As amostras de soro foram diluídas a 1:4 com meio Eagle, sem soro, e inativadas a 56°C, por 30 minutos.

Em cada orifício da placa de transferência foram colocados 0,025 ml de soro diluído a 1:4 e 0,025 ml de antígeno diluído (2U/0,025 ml). A mistura soro-antígeno foi incubada, em estufa de CO₂, a 25°C por 1 hora. Após este tempo, o conteúdo de cada orifício da placa de transferência foi inoculado, por justaposição e capilaridade, nos respectivos orifícios das microplacas com fundo chato, contendo culturas de células. As microplacas com culturas de células HeLa foram preparadas com 3 dias de antecedência e, no dia da inoculação, o meio foi trocado pelo meio Eagle com 1% de soro fetal bovino.

As microplacas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂, e as leituras foram realizadas diariamente. Foi feito simultaneamente o controle do soro na diluição de 1:4 e a retitulação paralela do vírus. O título neutralizante do soro foi definido como a diluição soro que inibiu o efeito citopático de 2 unidades de vírus/0,025 ml em 3 dias.

RESULTADOS

A percentagem de soros positivos no grupo etário de 0 a 4 anos, tanto para adenovírus tipo 1 como para o tipo 2, foi de 33,3% e, nos grupos etários acima de 5 anos, apresentou uma variação de 88,9 a 100%. A percentagem de soros positivos tanto para adenovírus tipo 3 como para o tipo 5, foi de 20% no grupo etário de 0 a 4 anos, e em indivíduos acima de 20 anos, houve uma variação de 71,9 a 92,8%. Quanto aos adenovírus tipos 4, 6 e 7, no grupo etário de 0 a 4 anos, as percentagens foram de 13,3; 6,7 e 6,7 respectivamente. Foi verificada nítida elevação da percentagem de soros positivos em indivíduos do grupo etário de 20 a 29 anos (78,6%) para adenovírus tipo

* Nissui Seiyaku Co. Ltd, Toshima-ku, Tokyo, Japan.

4 e, em indivíduos no grupo etário de 30 a 39 anos (76,9%), para adenovirus tipo 6. As percentagens de soros positivos para adenovirus tipo 7 variaram entre 6,7 e 36,4% (fig. 1).

No grupo etário de 0 a 4 anos, 40% das crianças demonstraram não possuir anticorpos para qualquer dos tipos de adenovirus

estudados. No grupo etário de 5 a 9 anos todos os indivíduos apresentaram anticorpos para mais de um tipo de ADV e, nos indivíduos acima de 10 anos, observou-se que 72,8% possuíam anticorpos para 4 a 6 tipos diferentes de ADV. Além disso, verificou-se que 3,9% de indivíduos possuíam anticorpos para todos os tipos de ADV (fig. 2).

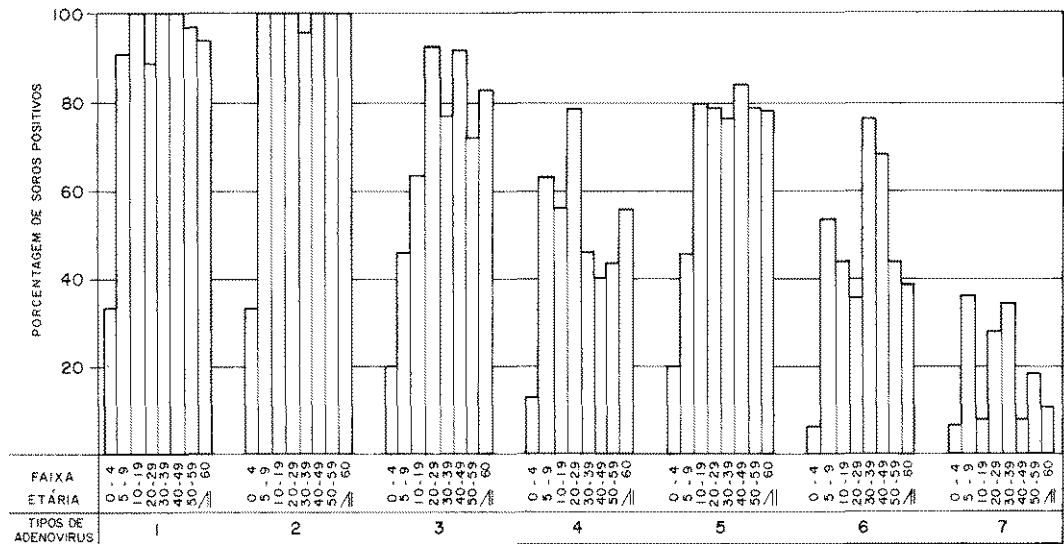


FIGURA 1 — Anticorpos neutralizantes em diferentes faixas etárias para cada tipo de adenovirus, em habitantes de São Paulo (1982).

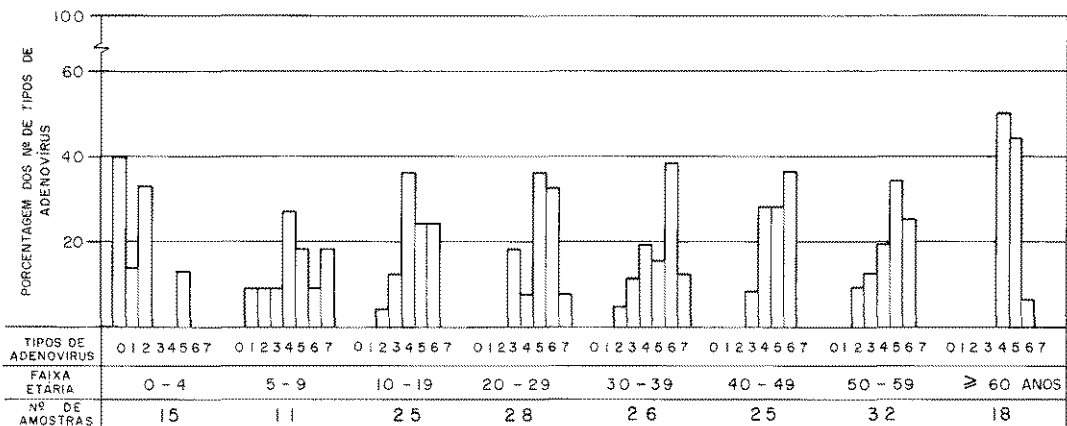


FIGURA 2 — Distribuição do número de tipos de adenovirus em habitantes da cidade de São Paulo (1982).

DISCUSSÃO

Embora o número de soros utilizados seja pequeno, a partir dos resultados obtidos podemos afirmar que adenovírus tipos 1, 2, 3 e 5 prevalecem na cidade de São Paulo. Esta prevalência também ocorre na maioria das áreas pesquisadas; Japão^{6, 11, 13, 14}, Estados Unidos^{7, 8, 15} e Taiwan¹², onde foram encontradas percentagens médias e altas de soros positivos. Porém, as percentagens de soros positivos foram baixas para ADV tipo 1, em Kansas, Estados Unidos; para ADV tipo 3, em Washington, Estados Unidos e em Gifu, Japão e, para ADV, tipo 5, em Cleveland, Estados Unidos.

Em relação aos ADV, tipos 4, 6 e 7, as percentagens por nós verificadas de soros positivos variaram conforme a idade, mas essa variação não foi significativa, pelo teste do χ^2 .

As percentagens observadas nos ADV tipos 4 e 6 foram menores quando comparadas às dos tipos 1, 2, 3 e 5; supõe-se que os tipos 4 e 6 ocorreram sob a forma de pequenos surtos ou sob forma esporádica, em São Paulo (1982).

Os resultados obtidos em relação ao ADV tipo 4, em São Paulo (1982), Okayama e Taiwan mostraram percentagens médias de soros positivos. No entanto, em Tóquio, Washington, Cleveland, Gifu, Kansas e em São Paulo (1960) as percentagens de soros positivos foram bem baixas.

Tanto para o tipo 6 como para o tipo 7, houve grande variação nas percentagens de soros positivos, conforme a área estudada. Os resultados obtidos com soros de São Paulo (1982) para ADV tipo 6 foram semelhantes aos resultados obtidos em Tóquio, Okayama,

Gifu e São Paulo (1960). Os estudos realizados em Taiwan mostraram percentagens mais elevadas e os realizados em Washington, Cleveland e Kansas mostraram percentagens um pouco menores.

Em relação ao ADV tipo 7, este foi o que apresentou menor percentagem de soros positivos em todos os grupos etários, permitindo concluir que este tipo de ADV é o menos prevalente na população de São Paulo. Estes resultados demonstraram percentagens de soros positivos semelhantes às de Cleveland, Gifu e Shiga, porém menores que os resultados obtidos em Tóquio, Taiwan, Kansas e São Paulo (1960).

Em relação à prevalência dos 7 tipos de ADV nas amostras por nós estudadas, quando comparada aos dados obtidos em estudos anteriores, por CARVALHO², em 1960, verificamos que houve certa semelhança nos resultados. Entretanto, o que despertou atenção especial para nossos dados foi a alta percentagem de soros positivos em indivíduos acima de 5 anos de idade, para adenovírus tipo 4 (48,3%), conforme demonstra a figura 2.

Agradecimentos

Ao Governo da Província de Shiga, Japão, por ter doado a bolsa de estudos para o estágio de especialização, que nos permitiu a realização deste trabalho; ao Dr. Bun-iti Nakagawa, Diretor do Instituto de Saúde Pública e Meio Ambiente da Província de Shiga, onde foi realizado este trabalho; ao Dr. Tokuda, por ter gentilmente cedido as culturas de células HeLa, e ao Dr. Takao Yoshii, por ter cedido os protótipos de adenovírus.

RIALA6/588

ISHIDA, M.A.; SAKAKIBARA, S. & YOKOTA, Y. — Neutralizing antibodies against types 1 to 7 adenovirus in inhabitants of the city of São Paulo, Brazil, 1982. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):179-183, 1984.

ABSTRACT: Neutralizing antibodies against types 1 to 7 adenovirus were titrated in 180 sera from 180 inhabitants of the city of São Paulo who belonged to various age groups. Blood specimens were collected in February, 1982. Antibodies against types 1, 2, 3, and 5 were found in 53.3% of the donors. Antibodies against types 1 and 2 were found 88.9% to 100% of the donors who were 5 or more years old. Antibodies against types 3 and 5 were detected in 71.9 to 92.8% of donors 20 or more years old. A mean of 50% of donors 5 or more years old showed antibodies against types 4 and 6 while 20% showed antibodies against type 7. It was found that 40% of children 0-4 year old had no antibody to the 7 study types while 72.8% of donors over 10-year old had antibodies against 4 to 6 serotypes.

DESCRIPTORS: adenovirus infection, human; antibodies, adenovirus neutralizing test.

ISHIDA, M.A.; SAKAKIBARA, S. & YOKOTA, Y. — Anticorpos neutralizantes para adenovírus tipos 1 a 7 em habitantes da cidade de São Paulo, Brasil, em 1982. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):179-183, 1984.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASHIHARA, Y.; KAWANA, R.; KIMURA, M. & HIRAYAMA, M. — *Métodos práticos para o diagnóstico de vírus* (Uirusu kensa-ro no dissai). Tokio, Editora Moderna, 1980. p. 200-3.
2. CARVALHO, R.P.S. — *Contribuição para o estudo dos adenovírus*. São Paulo, 1960. 129 p. [Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].
3. FOY, H.M. & GRAYSTON, J.T. — Adenoviruses. In: EVANS, A.S., ed. — *Viral infection of humans: epidemiology and control*. New York, Plenum med. Book, (1978). p. 53-69.
4. FUKUDA, Y. — Studies on the neutralizing antibody against adenovirus in childhood. Part I. Studies on age distribution of neutralizing antibody against adenovirus in Tokyo, Japan. *Acta paediatr. Jpn.* (overseas ed.), 63(7):1657-62, 1959.
5. GINSBERG, H.S. & DINGLE, J.H. — The adenovirus group. In: HORSFALL, F.L., JR. & TAMM, I., ed. — *Viral and rickettsial infections of man*. 4thed. Philadelphia, Igaku Shoin, 1972. p. 860-91.
6. HOSHIKA, T. — The age distribution of the neutralizing antibody against adenovirus (types 1-8) among the residents of Tokyo area. *Acta paediatr. Jpn.* (overseas ed.), 63(10):2363-9, 1959.
7. HUEBNER, R.J.; ROWE, W.P.; WARD, T.G.; PARROT, R.H. & BELL, J.A. — Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents. A new recognized group of common of the respiratory system. *New Eng. J. Med.*, 251(27):1077-86, 1954.
8. JORDAN, W.S., JR.; BADGER, G.F.; CURTISS, C.; DINGLE, J.H.; GINSBERG, H.S. & GOLD, E. — A study of illness in a group of Cleveland families. X. The occurrence of adenovirus infections. *Amer. J. Hyg.*, 64:336-48, 1956.
9. KASEL, J.A. — Adenoviruses. In: LENNETTE, E.H. & SCHMIDT, N.J., ed. — *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5thed. Washington, APHA, 1979. p. 229-55.
10. SAKAKIBARA, S. — Distribution of neutralizing antibodies to adenoviruses (type 3 and type 7) in Shiga Prefecture. *Jpn. J. med. Technol.* (Japan), 22(1):54-6, 1972.
11. SATO, Y. — Studies on adenovirus (I). *Virus, Japan*, 8(3):227-33, 1958.
12. TAI, FU-HSIANG & GRAYSTON, J.T. — Adenovirus neutralizing antibodies in persons on Taiwan. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 109:881-4, 1962.
13. WATANABE, M. — Adenovirus antibodies in Gifu Prefecture. *Jpn. J. public Health*, 15(9):797-802, 1968.
14. WATANABE, M.; NODA, S. & YAMADA, F. — Seroepidemic survey of adenoviruses in Gifu Prefecture, Japan, 1960-1980. *Clin. Virol., Japan*, 9(4):459-63, 1981.
15. WENNER, H.A.; BERAN, G.W.; WESTON, J.; CHIN, H.D.Y.; ANDERSON, N.W. & GOLDSMITH, R. — The epidemiology of acute respiratory illness. 1. Observations on adenovirus infections prevailing in a group of families. *J. infect. Dis.*, 101:275-86, 1957.

Recebido para publicação em 25 de abril de 1984.

ÍNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX

ALVES, V.A.F., 67
ARAÚJO, A.C., 29
ARAÚJO, M.F.L., 73, 81
BARRETTO, H.H.C., 149
BRANDILEONE, M.C.C., 115
CALZADA, C.T., 1, 161
CAVALCANTE, Z.M.O., 35
CHIEFFI, P.P., 25, 41, 47, 73, 81
CORRÊA, M.J., 133
CRUZ, A.S., 55
D'ANDRADE, O.M., 47
DIAS, A.M.G., 1, 161
DIAS, R.M.D.S., 41, 47
FERNANDES, S.A., 1, 161
FREITAS, I.W., 29
GELLI, D.S., 19
GERBI, L.J., 25
GODANO, A., 35
HOFER, E., 125
INOMATA, O.N.K., 149
IRINO, K., 1, 161
ISHIDA, M.A., 179
JAKABI, M., 19
KANO, E., 1, 161
KAWARABAYASHI, M., 35
LARA, W.H., 109, 149
LEE, I.M.L., 155
LUPETTI, N., 41, 47
MANGINI, A.C.S., 61, 67
MARTINEZ, C.H., 55
MELHEM, M.S.C., 35
MELLES, C.E.A., 115, 125, 155
NAKAHARA, L.K., 161
NAKAMURA, P.M., 25
NEME, S.N., 1, 115, 161
NUNES, E.V., 47
NUNES, L.R., 61
OLIVEIRA, J.J.V., 141
PEREIRA, L.E., 47
PESSÓA, G.V.A., 1, 115, 125, 161
PIRES, R.B.R., 35
PURCHIO, A., 87
RIBEIRO, M.A., 35
RIBEIRO, S.S., 73, 81
SABINO, M., 87, 101, 133
SAKAKIBARA, S., 179

SAKUMA, M.E., 55
SANTOS, C.C.M., 141
SCHLODTMANN, A.G., 61, 67
SOUZA, A., 19
SOUZA, A.M.C., 25
SPIR, M., 25
TAKAHASHI, M.Y., 109
TAKEDA, A.K., 29
TAUNAY, A.E., 155
TOLEZANO, J.E., 41, 47, 73, 81
TORRES, D.M.A.G.V., 47
UEDA, M., 25
VALENTIM, A.M., 73, 81
VAZ, T.M.I., 1, 115
VELLOSA, S.A.G., 61, 67
VIANNA, T.H.S., 35
VIEIRA, V.S.D., 115
WALDMAN, E.A., 25
YABIKU, H.Y., 109
YOKOTA, Y., 179
ZENEON, O., 133, 141
ZORZETTO, M.A.P., 87, 101

ÍNDICE DE ASSUNTO

- Acanthamoeba* sp.
em fezes humanas
frequência, 61
patogenicidade para camundongos
(estudo experimental), 67
- Ácido L-ascórbico
em produtos de panificação contendo
polissorbato 60 ou 80, determinação, 133
- Adenovírus
anticorpos
teste de neutralização, 179
- Aflatoxina
aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, determinação
em amendoim, 101
em farelo de amendoim, 101
aflatoxinas M₁, M₂, determinação
em leite de vaca, 87
- Água mineral
nitrato, determinação
método do eletrodo específico e método
da redução pela coluna de cádmio,
comparação, 141
- Amebas de vida livre
em fezes humanas
frequência, 61
isolamento, 67
- Amendoim
aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, determinação
cromatografia líquida de alta resolução,
101
- Amendoim, farelo
aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, determinação
cromatografia líquida de alta resolução,
101
- Anticorpos
adenovírus
teste de neutralização, 179
anti-*Cysticercus cellulosae*
em doentes mentais, 25
em população normal, 25
- Aves silvestres
hemoparasitas
São Paulo, Brasil, 41
- Bactérias aeróbicas
isolamento de hemocultura, 115
- Bactérias anaeróbicas facultativas
isolamento de hemocultura, 115
- Bactérias enteropatogênicas
isolamento de fezes, 161
- Beterraba (*Beta vulgaris*)
nitratos, determinação, 109
- Campylobacter jejuni*, 161
- Célula
linhagem celular de rim de vitelo (RV-IAL)
susceptibilidade a vírus, 55
- Cisticercose, 25
- Contaminantes
em alimentos
fosfina, resíduos, determinação, 149
- Corante Vermelho de beterraba
nitratos, determinação, 109
- Cysticercus cellulosae*, 25
- Escherichia coli*, 161
- Farelo de amendoim
veja Amendoim, farelo
- Fezes
bactérias enteropatogênicas, isolamento, 161
- Fosfina, resíduos
em alimentos, determinação, 149
- Hepatite A, B
linfócitos B, T, frequência, 29
- Infecção humana por adenovírus
anticorpos neutralizantes, 179
- Infecções bacterianas, prevalência
município de São Paulo, Brasil, 115
- Leite de vaca
aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, determinação
cromatografia líquida de alta resolução,
101
aflatoxinas M₁, M₂, determinação
cromatografia líquida de alta resolução,
87
antibióticos, detecção, 19
anti-sépticos, detecção, 19
contaminantes microbianos, detecção, 19
substâncias inibidoras, detecção, 19
- Leptospirose humana
anticorpos no soro, determinação
prova de hemaglutinação passiva, 35
imunodiagnóstico, 35

- Linfócitos B, T
na hepatite, frequência, 29
- Linhagem celular
rim de vitelo (RV-IAL)
susceptibilidade a vírus, 55
- Líquido cefalorraquidiano
substâncias antibacterianas
método de pesquisa, 155
- Listeria monocytogenes*, sorotipos
prevalência no Brasil, 125
- Listeriose humana, Brasil, 125
- Meningite
diagnóstico bacteriológico, 155
- Naegleria* sp.
em fezes humanas, frequência, 61
patogenicidade para camundongos
(estudo experimental), 67
- Nitrato
em água mineral, determinação, 141
- Nitratos
em beterraba, determinação, 109
em corante Vermelho de beterraba,
determinação, 109
- Pão, produtos
L-ácido ascórbico, determinação
polarografia, 133
- Parasitas
hemoparasitas em aves silvestres
São Paulo, Brasil, 41
- Proechimys iheringi*, 47
- Salmonella*, 161
sorotipos
frequência em São Paulo, Brasil, 1
- Shigella*, 161
- Substâncias antibacterianas
no líquido cefalorraquidiano
método de pesquisa, 155
- Taenia solium*, 25
- Triatoma infestans*
criação em laboratório
fertilidade, 81
repasto sanguíneo e desenvolvimento
ninfal, 73
sobrevivência, 81
- Trypanosoma (Herpetosoma)*, 47
- Vírus
cultivo em cultura de células de rim
de vitelo (RV-IAL), 55
infecção humana por adenovírus, 179
- Yersinia enterocolitica*, 161

SUBJECT INDEX

- Acanthamoeba* sp.
in human feces
frequency, 61
pathogenicity for mice
(experimental study), 67
- Acid
L-ascorbic acid in bread products
containing polysorbate 60 or 80,
determination, 133
- Adenovirus infection
antibodies
neutralizing test, 179
- Aflatoxin
aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, determination
in peanut, 101
in peanut flour, 101
aflatoxins M₁, M₂, determination
in cow milk, 87
- Amoeba
free-living amoeba
in human feces
frequency, 61
isolation, 67
- Antibacterial substances
in spinal fluid
research method, 155
- Antibodies
anti-*Cysticercus cellulosae*
in normal population, 25
in psychiatric patients, 25
- Bacteria
aerobic bacteria
isolation from blood culture, 115
facultative anaerobic bacteria
isolation from blood culture, 115
enteropathogenic bacteria
isolation from feces, 161
- Bacterial infections
prevalence, São Paulo municipality,
Brazil, 115
- Birds, wild
blood parasites
São Paulo, Brazil, 41
- Bread products
L-ascorbic acid determination
polarography, 133
- Campylobacter jejuni*, 161
- Cell line
calf kidney cell (RV-IAL)
susceptibility to virus, 55
- Cysticercosis, 25
Cysticercus cellulosae, 25
- Dyes
Red beet dye
nitrates, determination, 109
- Enteropathogenic bacteria
isolation from feces, 161
- Escherichia coli*, 161
- Feces
content of pathogenic bacteria, 161
- Food contaminants
phosphin residues determination, 149
- Hepatitis A, B
B, T lymphocytes, frequency, 29
- Leptospirosis, human
antibodies in serum, determination
passive hemagglutination test, 35
immunodiagnosis, 35
- Listeria monocytogenes*, serotypes
prevalence in Brazil, 125
- Listeriosis, human, Brazil, 125
- Lymphocytes B, T
in hepatitis, frequency, 29
- Meningitis
bacteriological diagnosis, 155
- Milk (cow milk)
aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, determination
high-performance liquid chromatogr., 87
aflatoxins M₁, M₂, determination
high-performance liquid chromatogr., 87
antibiotics, detection, 19
antiseptics, detection, 19
inhibiting substances, detection, 19
microbial contaminants, detection, 19
- Mineral water
see Water, mineral
- Naegleria* sp.
in human feces, frequency, 61
pathogenicity for mice
(experimental study), 67
- Nitrate
in mineral water, determination, 141

- Nitrates
 - in Red beet dye, determination, 109
 - in sugar-beet, determination, 109
- Parasites
 - blood parasites
 - in wild birds
 - São Paulo, Brazil, 41
- Peanut
 - aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, determination
 - high-performance liquid chromatogr., 101
- Peanut flour
 - aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, determination
 - high-performance liquid chromatogr., 101
- Phosphin residues
 - in foods, determination, 149
- Proechimys iheringi*, 47
- Red beet dye
 - nitrates, determination, 109
- Salmonella*, 161
 - serotypes
 - frequency in São Paulo, Brazil, 1
- Shigella*, 161
- Spinal fluid
 - antibacterial substances
 - research method, 155
- Sugar-beet (*Beta vulgaris*)
 - nitrates determination, 109
- Taenia solium*, 25
- Triatoma infestans*
 - laboratory rearing
 - blood meal and nymphal growth, 73
 - fertility, 81
 - survival, 81
- Trypanosoma (Herpetosoma)*, 47
- Virus
 - cultivation in calf kidney cell line (RV-IAL), 55
- Water, mineral
 - nitrate determination
 - cadmium-column method, selective
 - electrode method, comparison, 141
- Yersinia enterocolitica*, 161