



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
SÃO PAULO, SP - BRASIL

REVISTA
do
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

ISSN0073-9855

RIALA 6

VOLUME 49

NÚMERO 2

DEZEMBRO, 1989



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
SÃO PAULO, SP-BRASIL.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

REDATOR RESPONSÁVEL

ANÍSIO DE MOURA
Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

COMISSÃO DE REDAÇÃO

ODAIR ZENEBON, Presidente
CARMO ELIAS ANDRADE MELLES
ELISEU ALVES WALDMAN
ELZA SCHWARZ GASTALDO BADOLATO
JOSÉ EDUARDO TOLEZANO
JOSÉ LEOPOLDO FERREIRA ANTUNES
MYRNA SABINO
NEUS PASCUET PREGNOLATTO
VENÂNCIO AVANCINI FERREIRA ALVES

REDATOR-SECRETÁRIO

DEBORA DOMINGUES ESTRELLA REBOCHO

Endereço/address

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

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 — 1988, 1-48

1989, 49 (1, 2)

ISSN 0073-9855
RIALA6



CDD₁₈614.07205

(*) 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 Abstracts on Higiene and Communicable Diseases, AGRINDEX, Analytical Abstracts, Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Food Science and Technology Abstracts, Index Medicus Latino-americano, LILACS, SP: Saúde Pública, Microbiology Abstracts, Sumários Correntes Brasileiros, Toxicology Abstracts, Tropical Diseases Bulletin, Virology Abstracts e outros.

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigos

- 668 Fraudes e condições de higiene de doces em pasta
Microscopical detection of adulteration and sanity in fruit preserves
ZAMBONI, C.Q.; RODRIGUES, R.M.M.S.; SPITERI, N.; ALVES, H.L.; BATISTIC,
M.A.; ATUI, M.B. & SANTOS, M.C..... 125-129
- 669 Ocratoxina A em feijão comercializado no Estado de São Paulo e sua estabilidade no cozimento
Ochratoxin A in beans and its stability after cooking
MILANEZ, T.V. & SABINO, M..... 131-135
- 670 Utilização do meio de cultura Novobiocina-Nitrato-Sacarose (NNS) no diagnóstico presuntivo de *Staphylococcus saprophyticus*.
Use of NNS(Novobiocin-Nitrate-Sucrose) medium to differentiate Staphylococcus saprophyticus from other coagulase-negative staphylococci
TONDELLA, M.L.C; SACCHI, C.T.; BUSCHINELLI, S.S.O; CASAGRANDE, S.T.;
BRANDILEONE, M.C.C. & MILAGRES, L.G..... 137-143
- 671 Identificação e quantificação de adulterantes do óleo de dendê por meio de cromatografia em fase gasosa
Gas-chromatographic identification and quantification of palm oil adulterants
TAVARES, M.; BARBÉRIO, J.C.; BADOLATO, E.S.G.; MAIO, F.D. & CARVALHO,
J.B..... 145-150
- 672 Encontro de *Lutzomyia (Pintomyia) damascenoi*, Mangabeira, 1941 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Estado de São Paulo, Brasil
The finding of Lutzomyia (Pintomyia) damascenoi, Mangabeira, 1941 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in São Paulo State, Brasil
TANIGUCHI, H.H.; TOLEZANO, J.E. & D'ANDRADE, O.M..... 151-153
- 673 Determinação de deoxinivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada
Survey of deoxynivalenol in wheat and corn grain using thin-layer chromatography method
SABINO, M.; ICHIKAWA, A.H.; INOMATA, E.I. & LAMARDO, L.C.A..... 155-159

674	Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em crianças com diarreia no Município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil <i>Enteropathogenic bacteria occurrence in diarrheic children living in Juiz de Fora Municipality, Minas Gerais, Brazil</i> OLIVEIRA, M.G.; PESSÔA, G.V. & NAKAHARA, L.K.....	161-167
675	Expressão das proteínas p27 e p19 de vírus de leucose aviária em células não infectadas de galinha, pato e marreco <i>Expression of avian leukosis virus proteins p27 and p19 in uninfected chicken, drake and quail cells</i> SOUZA-FELIPPE, J. M. M. & HIGUCHI, T.....	169-178
676	Sistema digestor para destruição de matéria orgânica em análise de alimentos <i>Digestion system for destruction of organic matter in food analyses</i> SAKUMA, A.M.; OLIVEIRA, J.J.V.; ZENEBON, O.; TIGLEA, P. & SCORSARAVA, M.A.....	179-182
677	Determinação das principais características estruturais e químicas da droga <i>Anemopaegma arvense</i> (Vell) Stellfeld (catuaba) <i>Determination of main chemical and structural characteristics of the drug Anemopaegma arvense (Vell) Stellfeld (catuaba)</i> JORGE, L.I.F.; FERRO, V.O. & SAKUMA, A.M.....	183-191
678	Serotipos e piocinotipos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serotypes and pyocinotypes of Pseudomonas aeruginosa</i> VAZ, T.M.I; IRINO, K; LANDGRAF, LM; BRANDILEONE, M.C.C. & VIEIRA, V.S.D.....	193-198
679	Investigação etiológica em casos de conjuntivite hemorrágica aguda em regiões do Estado de São Paulo, Brasil, 1984 <i>Etiologic study of acute haemorrhagic conjunctivitis in regions of São Paulo State, Brasil, 1984</i> TAKIMOTO, S.; WALDMAN, E.A.; PEREIRA, M.S.; ROEBUCK, M.O; ISHIDA, M.A.; PAIVA, T.M.; GERBI, L.J.; MELLES, H.H.G.B. & ISHIMARU, T.....	199-205
680	Caracterização sorológica de <i>Flavobacterium meningosepticum</i> <i>Serological characterization of Flavobacterium meningosepticum</i> VAZ, T.M.I; IRINO, K.; CALZADA, C.T. & GONÇALVES, C.R.....	207-211
681	Avaliação da relação umidade/proteína em salsichas, com proteína texturizada de soja, antes e após o enlatamento <i>Evaluation of moisture/protein ratio in sausage (hot dog), with soybean texturized protein, before and after canning</i> TAVARES, M.; LOBANCO, C.M.; CARVALHO, J.B.; PENNACINO-AMARAL MELLO, M.R.; ANRAKU, T.Y & BOTTEZELLI, S.R.....	213-218
682	Epidemiologia da meningite por <i>Haemophilus influenzae</i> , no município de São Paulo, 1960-77 <i>Epidemiology of meningitis by Haemophilus influenzae in São Paulo Municipality, 1960-77</i> MORAES, J.C. & GUEDES, J.S.....	219-229

AOS COLABORADORES

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

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

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Os originais deverão ser redigidos na ortografia oficial, apresentados em duas vias (original e primeira cópia), datilografados com duplo entrelinhamento em folhas de papel tamanho ofício, com margens de 3 cm de cada um dos lados, numeradas com algarismos arábicos no ângulo superior direito. Evitar dividir as palavras no fim da linha, mesmo que a margem fique irregular, e nunca usar com este propósito barras ou sinais tipográficos para encher o espaço. No caso de ser utilizada máquina elétrica, usar a esfera de caracteres tipo redondo para o texto, reservando a esfera tipo itálico para palavras latinas ou de língua estrangeira.

No preparo do original, será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura:

Página de rosto

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

Texto

Introdução
Material e Métodos
Resultados
Discussão
Conclusões
Agradecimentos (se for o caso)

Material de referência

Resumos (em português e em inglês)
Descritores
Referências bibliográficas

TÍTULO — Deverá ser curto e específico, indicando precisamente o conteúdo do artigo; no caso de ser necessário título longo, recorrer a subtítulo.

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

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

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

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

- | | |
|-----|--|
| — | quando, pela natureza do fenômeno, não puder existir o dado; |
| Z | quando o dado for rigorosamente zero; |
| ... | quando não se dispuser do dado; |
| 0,0 | quando a aplicação dos critérios de arredondamento não permitir alcançar, respectivamente, os valores 1; 0,1; 0,01 etc.; |
| X | quando o dado for omitido para evitar a individualização da informação. |

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

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

Os gráficos, mapas, desenhos deverão ser feitos a nanquim preta, em papel vegetal, com letras e números escritos com nomográfico.

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

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

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

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

No texto — Serão citadas por meio de número índice correspondente ao da lista de referências, e escritas em versal; assim, para um autor... TAUNAY³¹ verificou...; para dois autores... LEME & CARRIJO¹⁹, pesquisando...; para mais de dois autores: No trabalho de TSUNODA *et alii*⁶; ou ainda... segundo vários autores^{1,3,7,8}.

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

Para artigos periódicos

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

Ex.:

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

Para livros

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

Ex.:

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

DA PUBLICAÇÃO

1. Os trabalhos destinados à publicação na *Revista do Instituto Lutz* deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz.
2. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação, que poderá sugerir ao autor alterações do original. Este original só será aceito quando tiver o visto da Comissão de Redação.
3. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.
4. Os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de recebimento, salvo o caso especial de nota prévia, que terá prioridade.
5. A data de recebimento do artigo constará obrigatoriamente no final do mesmo.
6. A primeira prova tipográfica será revisada pelo redator-secretário e conferida pelo autor, que a rubricará.
7. Os originais de trabalhos aceitos para publicação não serão devolvidos aos autores.
8. Os autores terão direito a 50 separatas; quando desejarem maior número, deverão entender-se com o redator-secretário da Revista.
9. É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, na conformidade da legislação sobre Direitos Autorais.

DA DISTRIBUIÇÃO

A *Revista do Instituto Adolfo Lutz* é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais, ou em permuta com periódicos nacionais ou estrangeiros.

FRAUDES E CONDIÇÕES DE HIGIENE DE DOCES EM PASTA*

Claydes de Quadros ZAMBONI**
Regina Maria M. Silva RODRIGUES**
Nazareth SPITERI**
Helena I. ALVES**
Mônica Arcon BATISTIC**
Márcia Bittar ATUI**
Marlene Correia dos SANTOS**

RIALA6/668

ZAMBONI, C.Q.; RODRIGUES, R.M.M.S.; SPITERI, N.; ALVES, H.I.; BATISTIC, M.A.; ATUI, M.B. & SANTOS, M.C. — Fraudes e condições de higiene de doces em pasta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):125-129, 1989.

RESUMO: Foram analisadas 360 amostras de seis tipos de doces em pasta: marmelada, goiabada, pessegada, bananada, doce de abóbora e doce de batata-doce (tipo marrom-glacê), a fim de pesquisar fraudes e verificar as condições de higiene. Verificou-se que 115 amostras estavam condenadas, sendo 95 (82,61%) fraudadas ou adulteradas com frutas de outra espécie vegetal, e 20 (17,39%) por conter fungos. Esses resultados indicam que o fabricante adulterou os produtos com frutas de preço inferior; os fungos indicam que foram utilizadas matérias-primas deterioradas ou tecnologia de processamento inadequada.

DESCRITORES: doces em pasta; análise microscópica; goiaba (*Psidium guajava*); pêssgo (*Prunus persica*); banana (*Musa sp*); abóbora (*Cucurbita pepo*); doce de batata-doce (*Ipomoea batatas*).

INTRODUÇÃO

A legislação em vigor^{2,4} define doce em pasta como o produto resultante do processamento adequado das partes comestíveis desintegradas de vegetais com açúcares, com ou sem adição de água, pectina, ajustador de pH e outros ingredientes e aditivos permitidos até uma consistência apropriada, acondicionado de forma a assegurar sua perfeita conservação.

O produto deverá estar praticamente isento de defeitos, tais como: matérias estranhas inócuas, fragmentos vegetais não comestíveis, ou outros, apresentados conforme o tipo de produto^{2,4}.

Os doces em pasta não podem apresentar sujidades, partes de insetos, fungos, leveduras, detritos orgânicos ou outras substâncias estranhas que indiquem a utilização de ingredientes em condições de higiene insatisfatórias, ou processamento tecnológico inadequado^{2,4}.

No trabalho elaborado na Seção de Microscopia Alimentar, tem-se verificado que nem sempre há o cumprimento da legislação quanto às condições de higiene e fraudes nos doces em pasta.

O presente trabalho tem, portanto, a finalidade de verificar as condições de higiene e as fraudes praticadas nos doces em pasta de cinco frutas diferentes e de batata-doce.

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 4º Encontro Nacional de Analistas de Alimentos (ENAA), Belo Horizonte, MG, 1988.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 360 amostras de doces em pasta, sendo 83 amostras de goiabada e 50 de bananada de 31 marcas diferentes, 52 de marmelada, 51 de pessegada e 50 amostras de doce de abóbora, de 17 marcas, e 74 amostras de doce de batata-doce, tipo marrom-glacê, de 24 marcas distintas. Parte das amostras foram colhidas pela Vigilância Sanitária e as demais foram adquiridas no comércio da Capital de São Paulo, de 1984 a 1988.

O método utilizado foi desenvolvido na Seção de Microscopia Alimentar, baseando-se em Menezes³.

Método para identificação dos elementos histológicos dos vegetais componentes do produto e pesquisa de vegetais estranhos.

Material

Béquer de 500 ml
 Bastão de vidro
 Bico de Bunsen com tela de amianto ou
 Placa de aquecimento elétrico
 Equipamentos para filtração a vácuo
 Papel de filtro qualitativo de filtração média
 Placa de Petri
 Lâminas e lamínulas para microscópio
 Espátula de metal
 Microscópio óptico

Reagentes

Água filtrada
 Água glicerinada
 Solução de lugol

Procedimento

Retirar pequenas porções de diferentes partes de amostra e colocar em um béquer de 500 ml. Juntar cerca de 200 ml de água filtrada e mexer com um bastão de vidro até dispersão completa do material. Aquecer para facilitar a dissolução do açúcar. Filtrar a vácuo sobre papel de filtro e transferir o papel para uma placa de Petri. Retirar, com espátula de metal, pequenas porções do material retido no papel e montar sobre lâminas com água glicerinada. Examinar ao microscópio óptico com aumentos de 100 a 400 vezes. Identificar os elementos histológicos característicos do vegetal em estudo, comparando-os com padrões ou com desenhos existentes na literatura especializada^{3,5}. Para verificar a presença de amido, natural da fruta ou estranho, preparar lâminas com solução de lugol e examinar ao microscópio óptico. Para a pesquisa de fungos, utilizar a técnica descrita em trabalho anterior^{1,6}.

RESULTADOS

Os resultados obtidos nas análises dos doces em pasta estão expressos nas tabelas 1 e 2.

DISCUSSÃO

Peça tabela 1, verifica-se que a fraude foi o principal problema detectado nos doces em pasta, responsável pela condenação de 95 (82,61%) amostras.

Constatou-se que em 5 (10%) amostras de doce de abóbora, em 3 (5,77%) de marmelada e em 1 (1,2%) de goiabada houve a substituição to-

TABELA 1

Classificação das 360 amostras de doces em pasta quanto à presença de fraudes e às condições higiênicas

Doces em Pasta	Amostras analisadas Nº	Quanto à presença de fraudes				Quanto às condições higiênicas			
		Aprovadas Nº	%	Condenadas Nº	%	Satisfatória Nº	%	Insatisfatória Nº	%
Goiabada	83	58	69,88	21	25,30	77	92,77	6	7,23
Marmelada	52	46	88,46	6	11,54	52	100,00	0	0,00
Pessegada	51	42	82,35	9	17,65	42	82,35	9	17,65
Bananada	50	47	94,00	3	6,00	49	98,00	1	2,00
Doce de abóbora	50	36	72,00	14	28,00	46	92,00	4	8,00
Doce de batata doce (tipo marrom-glacê)	74	32	43,24	42	56,76	74	100,00	0	0,00

TABELA 2

Incidência de amostras de doces em pasta condenadas por fraude e matéria estranha.

Tipos de fraudes e de matéria estranhas	Amostras condenadas/total analisadas (percentagem)					
	Goiabada	Marmelada	Pessegada	Bananada	Doce de abóbora	Doce de batata-doce
Abóbora	0/83	0/52	0/51	0/50	0/50	7/74 (9,46)
Banana	2/83 (2,41)	1/52 (1,92)	0/51	0/50	13/50 (26,00)	0/77
Batata-doce	0/83	0/52	0/51	0/50	13/50 (26,00)	0/74
Goiaba	0/83	0/52	0/51	1/50 (1,20)	0/50	2/74 (2,70)
Laranja	2/83 (2,41)	0/52	1/51 (1,96)	2/50 (4,00)	0/50	0/74
Maçã	6/83 (7,23)	0/50	0/51	0/50	0/50	0/74
Marmelo	6/83 (7,23)	0/52	0/51	0/50	0/50	0/74
Goiaba e laranja	0/83	3/52 (5,77)	4/51 (7,84)	0/50	0/50	0/74
Marmelo e laranja	1/83 (1,20)	0/52	0/51	0/50	0/50	0/74
Marmelo e pêra	1/83 (1,20)	0/52	0/51	0/50	0/50	0/74
Ameixa e mamão	1/83 (1,20)	0/51	0/52	0/50	0/50	0/74
Marmelo, goiaba e laranja	0/83	0/52	2/51 (3,92)	0/50	0/50	0/74
Abóbora, laranja marmelo e pêra	1/83 (1,20)	0/52	0/51	0/50	0/50	0/74
Laranja e subst. amilífera	1/83 (1,20)	1/52 (1,92)	1/51 (1,96)	0/50	0/50	0/74
Fécula de mandioca	0/83	0/52	1/51 (1,96)	0/50	0/50	0/74
Goma-guar	0/83	1/52 (1,92)	6/51 (11,76)	0/50	0/50	33/74 (44,59)
Bolor	10/83 (12,05)	0/52	9/51 (17,65)	0/50	2/50 (4,00)	0/74
Bolor e açúcar	0/83	0/52	0/51	0/50	1/50 (2,00)	0/74
Bolor e inseto	0/83	0/52	0/51	0/50	1/50 (2,00)	0/74

tal da fruta em questão por outros vegetais. Nas demais amostras desses doces e nas pessegadas, bananadas e doces de batata-doce, verificou-se que a substituição do vegetal característico por outros foi parcial. Tais constatações, provavelmente, se devem à insuficiência da espécie durante certas épocas do ano ou ao reduzido custo das outras em relação à espécie requerida. Outro fator que contribui para a presença de vegetais estranhos no produto é a ineficiência na lavagem dos tachos de preparo. A prática insatisfatória da lavagem, além de possibilitar a mistura dos resíduos de um vegetal com outro, também contribui para o aumento de fungos no produto.

A maior porcentagem de amostras de goiabada condenadas por fraudes foi devida à substituição parcial da goiaba por marmelo (7,23%), seguido pela substituição por maçã (6,83%) e em menor escala por laranja (2,41%) ou com misturas de marmelo, laranja e abóbora ou marmelo e banana ou marmelo e laranja ou marmelo e pêra (tabela 2).

A substituição parcial do marmelo foi por goiaba e laranja (5,77%) e por banana (1,92%) (tabela 2).

Nas pessegadas, a maior causa de reprovação foi a presença de mistura de duas frutas, além de pêssego: goiaba e laranja (5,88%), seguida pela mistura de marmelo, goiaba e laranja (3,92%). Foi constatado que uma amostra (1,96%) continha laranja e, outra, fécula de mandioca (tabela 2), além de pêssego.

Em relação a todos os doces em pasta analisados, a bananada apresentou o menor índice de fraude (6,00%), constatando-se a substituição parcial da banana por laranja e por goiaba (tabela 2). Das 50 amostras de doce de abóbora analisadas, verificou-se que 26% continham batata doce e 2%, amido de milho, além de abóbora.

Pela tabela 1, observa-se que o doce de batata-doce, tipo marrom-glacê, apresentou a maior porcentagem de condenação por fraude (56,76%). Verificou-se que 7 amostras (9,46%) continham batata-doce e abóbora, 2 (2,70%) batata-doce e goiaba. A presença dessas frutas talvez confira cor mais atraente ao doce ou melhore a consistência, devido à insuficiência de substâncias pécticas na batata-doce.

A legislação em vigor^{2,4} permite usar como coadjuvante na tecnologia de fabricação de doces em pasta, pectina, ágar-ágar e goma garrofin (goma alfarroba) em quantidade para compensar possível deficiência de substâncias pécticas nos

ingredientes. Esses coadjuvantes devem ser mencionados na relação de ingredientes dos dizeres de rotulagem.

Sendo a goma-guar um espessante e tendo sido constatada sua presença em alguns tipos de doce em pasta, pode-se supor que sua adição foi proposital, caracterizando a fraude intencional.

A presença de goma-guar foi responsável pela condenação de 44,59% das amostras de doce de batata-doce, de 1,92% das marmeladas e de 1,96% das amostras de pessegada. Em nenhum desses casos havia, na rotulagem, menção do emprego de coadjuvantes de tecnologia de fabricação.

Quanto às condições higiênicas dos doces em pasta (tabela 1), verifica-se que, com exceção da marmelada e do doce de batata-doce, os demais apresentaram-se insatisfatórios, devido, principalmente, à presença de fungos. A pessegada foi o doce que apresentou pior qualidade, apresentando 17,65% de amostras contaminadas.

Em trabalho anterior⁶, foi salientado a presença de fungos filamentosos em doces em pasta. Comparando os resultados obtidos nesta pesquisa com os da anterior, verificou-se que os doces de fruta em pasta continuam apresentando fungos. As marmeladas ora analisadas apresentaram melhor qualidade e as pessegadas pioraram em relação às estudadas anteriormente.

CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos, conclui-se que:

a) Continuam sendo praticadas fraudes em doces em pasta, tanto pela substituição total como pela parcial do vegetal por outro. Das 360 amostras analisadas, 92 (25,56%) foram condenadas por fraude.

b) O doce de batata-doce, tipo marrom-glacê, e a goiabada foram os doces que apresentaram maior número de amostras condenadas, 56,76% e 30,12%, respectivamente.

c) Como coadjuvante da tecnologia de fabricação, está sendo utilizado ingrediente não permitido pela legislação², principalmente goma-guar em doce de batata-doce, tipo marrom-glacê.

d) Os doces de fruta em pasta continuam apresentando condições higiênicas insatisfatórias devido à presença de fungos filamentosos.

RIALA6/668

ZAMBONI, C.Q.; RODRIGUES, R.M.M.S.; SPITERI, N.; ALVES, H.I.; BATISTIC, M.A.; ATUI, M.B. & SANTOS, M.C. — Microscopical detection of adulteration and sanity in fruit preserves. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):125-129, 1989.

ABSTRACT: Samples of six kinds of fruit preserves (or jams) of quince, guava, peach, banana, pumpkin and sweet-potato were examined for fraud, for adulteration and for sanity. Microscopic examination showed that 115 of the 360 samples were discording with Brazilian legislation: 95 (82,61%) were adulterated with fruits of other kinds and 20 (17,39%) with mycelia filaments. It was detected guar-gum in sweet-potato preserve disagreeing with the legislation.

DESCRIPTORS: Fruit preserves (or jams), quince (*Pyrus cydonia*), guava (*Psidium guajava*), peach (*Prunus persica*), banana (*Musa sp*), pumpkin (*Cucurbita pepo*), sweet-potato (*Ipomoea batatas*); adulteration, microscopical examination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 14th ed. Washington, D.C., AOAC, 1984. p.,930.
2. BRASIL. Leis, decretos etc. Resolução Normativa nº 12/78, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Seção I, pt. 1, p. 19.825. Aprova normas técnicas especiais do Estado de São Paulo, relativas a alimentos (e bebidas)...
3. MENEZES JUNIOR, J.B.F. — Investigação sobre o exame microscópico de algumas substâncias alimentícias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 9:18-77, 1949.
4. SÃO PAULO. Leis, decretos etc. Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 de out. 1978, p. 13 (NTA 28). Aprova normas de técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.
5. WINTON, A. B. & WINTON, K. B. — *The structure and composition of foods*. New York, John Wiley, 1939. v. 2, p. 102-803.
6. ZAMBONI, C. Q.; ALVES, H.I. & SANTOS, M.C., — Contagem de filamentos micelianos em doces em pasta de goiaba, marmelo, pêssego e figo, pelo método de Howard. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(1):31-5, 1981.

Recebido para publicação em 26 de janeiro de 1989.

OCRATOXINA "A" EM FEIJÃO COMERCIALIZADO NO ESTADO DE SÃO PAULO E SUA ESTABILIDADE NO COZIMENTO*

Thais Valéria MILANEZ**
Myrna SABINO**

RIALA6/669

MILANEZ, T.V. & SABINO, M. - Ocratoxina A em feijão comercializado no Estado de São Paulo e sua estabilidade no cozimento. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (2):131-135, 1989.

RESUMO: Para verificar a presença de ocratoxina A em feijão consumido no Estado de São Paulo, foram analisadas 60 amostras colhidas em diferentes regiões. As determinações foram feitas por cromatografia em camada delgada pelo método descrito por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, ligeiramente modificado, e cujo limite de determinação foi de 30 µg/kg. Os resultados dos testes de recuperação, efetuados em vários níveis de concentração da micotoxina, variaram de 108 a 159%. Em nenhuma das amostras analisadas foi detectada presença da ocratoxina A. O estudo da estabilidade da micotoxina, com cozimento úmido e sob pressão, demonstrou uma diminuição de 20,1 a 76,7% de seu teor.

DESCRIPTORIOS: ocratoxina A, determinação em feijão; feijão, determinação de ocratoxina A; estabilidade da ocratoxina A; cromatografia em camada delgada.

INTRODUÇÃO

A ocratoxina A, micotoxina produzida por espécies de fungos *Aspergillus ochraceus* Wilhelm e *Penicillium viridicatum* Westling^{5,7,16}, é a mais tóxica de seus vários tipos. Estudos mostraram que ela é nefrotóxica para animais^{8, 16}, porém a sua carcinogenicidade ainda não foi devidamente comprovada^{8,10,16}.

A ocratoxina A poderá entrar na cadeia alimentar do homem e afetar a sua saúde, através da ingestão de alimentos com fungos ou de animais de abate que foram tratados com ração contaminada. Essas micotoxinas têm sido encontradas como contaminantes naturais em alimentos tais como cevada, trigo, milho, feijão, café e farinha de mandioca crua, e em ração animal^{13,14}.

A ocratoxina A é relativamente estável ao calor úmido⁹, porém foi observada a sua inativação

total em grãos de café submetidos à torrefação¹⁶. Em trabalhos experimentais, envolvendo enlatamento de feijão, foi verificada perda de 10 a 21% da toxina, no tratamento térmico^{2,4,10}.

Sendo o feijão alimento básico da população brasileira e devido a sua susceptibilidade à contaminação por ocratoxina A, foi proposto estudo para verificar os níveis da toxina no produto consumido no Estado de São Paulo, bem como sua estabilidade durante o processo usual de cozimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 60 amostras de feijão provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo, para determinação da ocratoxina A. Algumas delas foram adquiridas em pontos-de-venda na cidade de São Paulo, e outras obtidas a partir de remessas efetuadas ao IAL, para análise (tabela 1).

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

O método empregado foi descrito por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA¹², com modificações impostas pela disponibilidade de equipamentos e materiais.

De cada amostra de feijão foi separada uma alíquota de 30g de grãos, que foi triturada em multiprocessador. A micotoxina foi extraída com 180ml de metanol e 20 ml de solução de cloreto de sódio a 4%, em agitador mecânico, por uma hora. Em seguida, o material foi filtrado em papel Whatmann nº 1. A 100ml do filtrado foram adicionados 100ml de solução de sulfato de cobre a 10% e celite em quantidade suficiente para ocupar um bquer de 30ml. O material resultante foi agitado e filtrado; 100ml do filtrado foram transferidos para funil de separação contendo 100ml de água destilada. A ocratoxina A foi extraída com duas porções de 20ml de clorofórmio. Alíquotas de 10ml de cada extração foram reunidas em Erlenmeyer de 30ml e evaporadas em banho-maria. O resíduo foi dissolvido em 200µl de metanol e cromatografado em camada delgada usando placa de sílica.

O cromatograma foi desenvolvido em mistura de tolueno, acetato de etila e ácido fórmico (50+40+10). A placa foi examinada sob luz ultravioleta e a micotoxina foi quantificada por comparação visual da fluorescência da amostra com a do padrão de ocratoxina A.

No caso de feijão cozido, o método utilizado não proporcionou a limpeza necessária para que fosse feita a quantificação final com clareza; desta forma, foi acrescentada à técnica já descrita uma etapa extra de purificação que consistiu na percolação da amostra numa minicoluna de sílica, o cartucho "SEP PAK Si"⁶. O resíduo obtido da evaporação do extrato clorofórmico da amostra foi redissolvido com duas alíquotas de 0,5ml de tolueno e transferido quantitativamente para o cartucho, previamente tratado com 10ml de tolueno. Após lavagem da amostra com 10ml de tolueno, a ocratoxina A foi eluída com 10ml da mistura de tolueno e ácido acético (9+1) e evaporada até resíduo em banho-maria, sob corrente de nitrogênio⁶. Em seguida foi desenvolvida a cromatografia em camada delgada, descrita anteriormente.

TABELA 1

Procedência das amostras de feijão, classificação e relação dos resultados falsos positivos

Amostras analisadas	Procedência	Classificação (*)	Resultados falsos positivos
01	Araçatuba	Grupo I, classe cores	01
01	Campinas	Grupo I, classe cores	-
01	Guarujá	Grupo I, classe cores	-
02	Ibitina	Grupo I, classe cores	-
02	Ibitina	Grupo II, classe cores	01
01	Itariri	Grupo I, classe cores	-
10	Juquiá	Grupo I, classe cores	-
01	Mairinque	Grupo I, classe cores	-
01	Mirandópolis	Grupo I, classe cores	-
02	Registro	Grupo I, classe cores	-
01	S.J. Rio Preto	Grupo I, classe cores	-
01	São Paulo	Grupo I, classe branco	-
06	Idem	Grupo I, classe preto	01
03	Idem	Grupo I, classe cores	-
20	Idem	Grupo I, classe cores	04
01	Idem	Grupo I, classe cores	-
01	Idem	Grupo II, classe cores	-
01	Idem	Grupo II, classe cores	-
02	Sorocaba	Grupo I, classe cores	-
01	Suzano	Grupo I, classe preto	01
01	Tatuí	Grupo I, classe cores	-
60			08

* Classificação segundo a Portaria nº 161 de 24/7/87 do Ministério da Agricultura, Brasil¹

O cozimento do feijão foi feito em autoclave, a 121°C por 20 minutos, simulando-se o processo da panela de pressão. Após esfriamento, a amostra foi triturada em liquidificador e uma alíquota de 30g foi retirada para análise.

Para confirmação da presença de ocratoxina A, a placa foi exposta a vapores de amônia, que têm a propriedade de mudar a cor da fluorescência verde-azulada para azul intensa^{9,11,15}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observando-se a tabela 1, verifica-se a existência de resultados falsos positivos. São assim considerados porque não foram confirmados na exposição da placa aos vapores de amônia. Este método não é considerado por muitos como decisivo para confirmação da presença de ocratoxina A, porém é válido para indicar a ausência desta micotoxina^{11,15}.

A técnica utilizada para essas análises foi testada em diversos níveis de recuperação e os dados obtidos constam da tabela 2.

Foi experimentada a recuperação da ocratoxina A na concentração de 50 µg/kg, pois é o valor que consta da proposta de limite de tolerância da ocratoxina A para a legislação brasileira (Recomendação do IV Encontro Nacional de Micotoxina, São Paulo, 1986).

Embora o limite de detecção de ocratoxina A pelo método proposto seja de 5,7 ng, considera-

se como limite de determinação 30 µg/kg, que é o valor onde há segurança razoável para quantificação da intensidade da fluorescência desenvolvida pela amostra.

O procedimento usual de análise não se mostrou adequado para a quantificação de ocratoxina A no feijão cozido. Após o cozimento, surgem várias manchas, inclusive fluorescentes no cromatograma com diferentes Rf, mascarando a visualização da ocratoxina A. Para contornar este problema, há necessidade de uma limpeza maior do cromatograma final. Assim, acrescentou-se uma etapa extra de limpeza, que consistiu no uso de uma minicoluna de sílica, no caso o cartucho SEP-PAK Si. Vários sistemas de solventes foram testados, porém o mais eficiente foi o tolueno + ácido acético (9+1), que já havia sido utilizado por HOWELL & TAYLOR⁶.

Os dados que constam na tabela 2 referentes à recuperação e reprodutibilidade da técnica mais etapa extra de limpeza são bem variáveis, porém aceitáveis estatisticamente (teste de Dixon). Acredita-se que essa variação foi gerada pela própria etapa extra-adicionada. O uso do cartucho de sílica SEP-PAK Si já sugeriu este tipo de observação por parte de outros autores⁶. Provavelmente este seja um dos fatores de variação dos resultados do experimento com feijão contaminado e cozido, onde se verificou uma destruição de 20,1 a 76,7% da ocratoxina A (tabela 3).

HARWIG et alii⁴ observaram perdas de 21 e 10% de ocratoxina A em feijão que ficou de molho e naquele que sofreu branqueamento, respectivamente. Feijões enlatados antes do aquecimento ainda continham 64% do total de ocratoxina A adicionada e 53%, após uma hora de aquecimento. EL BANNA & SCOTT³ verificaram médias de destruição de ocratoxina A em feijão fava, por ocasião de seu cozimento, de 15,5% a 100°C por

TABELA 2

Recuperação e reprodutividade em feijão adicionado de ocratoxina A, usando técnica adaptada de SOARES & RODRIGUES AMAYA¹²

Nível de ocratoxina A (µg/kg)	% de recup. (*)	cv	dp
10	159,6	7,1	11,4
30	103,7	10,8	11,2
50	108,8	13,4	14,5
200	108,7	8,5	9,3
200**	122,1	15,9	19,4

* média de cinco determinações
 cv = coeficiente de variação
 dp = desvio padrão
 ** com etapa extra de limpeza

TABELA 3

Quantidade de ocratoxina A recuperada após o cozimento do feijão contaminado artificialmente com 200 µg/kg da toxina

Experimento n°	Recuperação %
1	44,4
2	35,5
3	79,9
4	23,3
5	36,7

% média de recuperação: 44,0
 Desvio padrão: 9,6
 Coeficiente de variação: 21,8

6h e de 19,6% a 115,5°C por 2h. TRENK et alii apud EL BANNA & SCOTT³ obtiveram, em rações contendo aveia e arroz, após autoclavagem por 3 horas sem adição de água, perdas de 87,5 e 86% de ocratoxina A, respectivamente, e de 74 e 68,5%, sob as mesmas condições, porém na presença de água (50% volume/peso).

Para cada um dos níveis de recuperação, foram feitas cinco determinações e os resultados passaram pelo teste estatístico de Dixon. Os dados obtidos para 10µg/kg foram os únicos não adequados para uma aceitação de 95%. Considerou-se o limite de 30 µg/kg como seguro para quantificação da ocratoxina A pelo método de comparação visual por cromatografia em camada delgada, conforme a técnica de SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA¹², com as adaptações incorporadas.

Apesar deste levantamento não detectar a presença de ocratoxina A nas amostras examinadas, isto não significa a inexistência do problema dos fungos produtores desta micotoxina no nosso meio ambiente. Principalmente, à vista de

uma amostra, isenta de micotoxinas, armazenada em condições de laboratório, ter apresentado, posteriormente, ocratoxina A. Dos feijões mofados foram isoladas duas diferentes cepas de *Aspergillus* spp., uma delas de coloração ocrácea em meio de cultura.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

1. O método do cozimento do feijão não destrói totalmente a ocratoxina A no material artificialmente contaminado.

2. Estudos mais complexos tornam-se necessários, envolvendo análise de um número maior de amostras e dos efeitos de parâmetros mais específicos na produção de ocratoxina A, como temperatura, umidade do substrato e tipo de armazenagem, à vista de ausência, na legislação brasileira, de limites de tolerância para esta micotoxina em alimentos.

RIALA6/669

MILANEZ, T.V. & SABINO, M. — Ochratoxin A in beans and its stability after cooking. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):131-135, 1989.

ABSTRACT: Sixty samples of beans from different regions of São Paulo State were tested for ochratoxin A. Determinations were made by thin layer chromatography and the method described by SOARES & RODRIGUES AMAYA, slightly modified. It gave a determination limit of 30 µg/kg. Recoveries tested at different levels (10,30,50 and 200 µg/kg) ranged from 108 to 159%. Ochratoxin A was not present in any sample tested. Average destruction of 20.1 to 76.7% of ochratoxin A occurred during cooking. The traditional method of beans cooking does not destroy totally the mycotoxin present in contaminated beans. Because there is no provision in Brazilian laws of tolerance levels of this mycotoxin it is necessary further research to determine the adequate levels of ochratoxin A in foodstuffs.

DESCRIPTORS: ochratoxin A, beans, ochratoxin A stability, thin-layer chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Leis decretos etc. - Portaria n.º 161, de 24 de julho de 1987, do Ministério da Agricultura. *Diário Oficial*, Brasília, 28 de julho de 1987, Seção 1. p. 11.946. Aprova a norma a ser observada na padronização, classificação, embalagem e apresentação do feijão.
2. BULLERMAN, L.B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. *J. Food Prot.*, 42 (1): 65-86, 1979.
3. EL BANNA, A.A. & SCOTT, P.M. Fate of mycotoxins during processing of food stuffs. III. Ochratoxin A during cooking of faba beans (*Vicia faba* L.) and polished wheat. *J. Food Prot.*, 47(3): 189-92, 1984.
4. HARWIG, J.; CHEN, Y.K. & COLLINS-THOMPSON, D.L. Stability of ochratoxin A in beans during canning. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 7(4): 288-9, 1974.
5. HESSELTINE, C.W.; VANDERGRAFT, E.E.; FENNEL, D.I.; SMITH, M.L. & SHOTWELL, O.L. - *Aspergilli* as ochratoxin producers. *Mycologia*, 64: 539-50, 1972.
6. HOWELL, M.V. & TAYLOR, P.W. Mycotoxins: determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone in mixed feeds, with detection by thin layer chromatography or high performance liquid chromatography. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 64 (6): 1.356-63, 1981.
7. MERWE, K.S. van der, STEYN, P.S.; FOURIE, L;

- SCOTT, D.E.B. & THERON, J.J. Ochratoxin A: a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 295: 1.112-3, 1965.
8. MUNRO, I.C.; SCOTT, P.M.; MOODIE, A. & WILLIS, R.F. Ochratoxin A: occurrence and toxicity. *J. am. Vet. med. Assoc.* 163(11): 1.269-73, 1973.
9. NESHEIM, S. The ochratoxins and other related compounds. *Adv. Chem. Ser.*, 149: 276-95, 1976. [Separata]
10. RIBELIN, W.E. - Mycotoxicoses of domestic and laboratory animals, poultry and aquatic invertebrates and vertebrates. In: WILLIE, T.D. & MOREHOUSE, L.G. eds. - *Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses, and encyclopedic handbook*. New York, Marcel Dekker, 1978, v. 2, p. 28-35.
11. SCOTT, P.M. & HAND, T.B. Method for the detection and estimation of ochratoxin A in some cereal products. *J. Assoc. off. anal. Chem.* 50(2): 366-71, 1967.
12. SOARES, L.M.V. - *Micotoxinas: um método para análise simultânea e incidência em alimentos comercializados na região de Campinas*. Campinas, 1987, 129 p. [Tese Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas]
13. SOARES, L.M.V. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Screening and quantification of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice and cassava. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 68(6): 1.128-30, 1985.
14. STOLOFF, L. - Mycotoxins as potential environmental carcinogens. In: STICH, H.F. ed. *Carcinogens and mutagens in the environment*. Boca Raton, Fla., CRC Press, 1982, v. 1.
15. TRENK, H.L. & CHU, F.S. Improved detection of ochratoxin A on thin layer plates. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 54(6): 1.307-09, 1971.
16. WHO TASK GROUP ON ENVIRONMENTAL - HEALTH CRITERIA FOR MYCOTOXINS, Geneva 1978. *Mycotoxins*. Geneva, UNEP/WHO, 1979, p. 86-108/Environmental Health Criteria, 11.

Recebido para publicação em 6 de março de 1989.

UTILIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA NOVOBIOCINA-NITRATO-
SACAROSE (NNS) NO DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE
*STAPHYLOCOCCUS SAPROPHYTICUS**

Maria Lúcia Cecconi TONDELLA**
Cláudio Tavares SACCHI**
Sônia Shizue Okita BUSCHINELLI**
Silvana Tadeu CASAGRANDE**
Maria Cristina de Cunto BRANDILEONE**
Lucimar Gonçalves MILAGRES***

RIALA6/670

TONDELLA, M.L.C.; SACCHI, C.T.; BUSCHINELLI, S.S.O.; CASAGRANDE, S.T.;
BRANDILEONE, M.C.C. & MILAGRES, L.G. — Utilização do meio de cultura
Novobiocina-Nitrato-Sacarose (NNS) no diagnóstico presuntivo de
Staphylococcus saprophyticus. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 49(2):137-143, 1989.

RESUMO: O meio de cultura NNS, constituído de púrpura de bromocresol, nitrato de potássio, sacarose e novobiocina, foi utilizado na diferenciação de *Staphylococcus saprophyticus* isolados de urina. Na formulação do meio NNS, a resistência à novobiocina, característica normalmente utilizada no diagnóstico presuntivo de *Staphylococcus saprophyticus*, foi associada a sua capacidade de utilizar a sacarose e à ausência da enzima nitrato-redutase, visando a diferenciação deste microorganismo dos demais estafilococos coagulase negativa, inclusive os igualmente resistentes à novobiocina (*Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus sciuri*). Os *Staphylococcus cohnii* não utilizam a sacarose (88% das cepas), enquanto os *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus sciuri* reduzem nitrato a nitrito em 100 e 80% das cepas, respectivamente. De 74 cepas de estafilococos coagulase negativa isoladas de urina, 49 (66,2%) cepas de *Staphylococcus saprophyticus* foram diferenciadas pelo meio NNS, tendo sido obtidos resultados de valor predicativo de resultado positivo de 100%, sensibilidade de 95,9%, especificidade de 100% e eficiência de 97,2%. As cepas foram posteriormente caracterizadas ao nível de espécie, segundo esquema proposto por KLOOS e SCHLEIFER, quando se obteve 66,2% de *Staphylococcus saprophyticus*, 13,5% de *Staphylococcus simulans*, 8,1% de *Staphylococcus epidermidis*, 5,4% de *Staphylococcus haemolyticus*, 5,4% de *Staphylococcus hominis* e 1,4% de *Staphylococcus sp.* O comportamento do meio NNS foi avaliado através de cepas de referência das diferentes espécies do gênero *Staphylococcus*.

DESCRITORES: *Staphylococcus saprophyticus*; estafilococos coagulase negativa; infecção do trato urinário; resistência à novobiocina.

INTRODUÇÃO

Os estafilococos coagulase negativa (ECN) têm sido freqüentemente apontados como agentes patogênicos oportunistas, especialmente nos casos de infecções após intervenções cirúrgicas, endocardites bacterianas subagudas, peritonites, meningites bacterianas etc.^{6,9,30}.

A partir de 1970, inicialmente na Europa e posteriormente nos EUA e Canadá, uma espécie particular de ECN, *S. saprophyticus*, vem sendo reconhecida como agente etiológico de infecções do trato urinário em mulheres jovens^{1,3,12,23}.

O diagnóstico laboratorial presuntivo das infecções urinárias causadas pelo *S. saprophyticus*

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Aluna de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP.

tem sido principalmente feito pela demonstração de sua resistência à novobiocina na concentração de 5 mcg/ml^{18,24,25}. A caracterização bioquímica deste microorganismo, bem como dos demais ECN ao nível de espécie, tem sido feita segundo o esquema proposto por KLOOS & SCHLEIFER^{17,18,28,29}, pelo sistema API STAPHIDENT²⁰, ou pelo sistema de caracterização e biotipagem recentemente proposto por HERBERT et alii^{14,15}. É sabido, entretanto, que outros ECN (*S. cohnii*, *S. xylosus* e *S. sciuri*) são igualmente resistentes à novobiocina^{19,28}, e que algumas cepas de *S. epidermidis* resistentes a esta droga já foram registradas³³.

O fato acima mencionado levou-nos à pesquisar outras características diferenciais que tornassem possível a separação do *S. saprophyticus* dos demais ECN resistentes à novobiocina. Através do sistema de caracterização bioquímica de KLOOS & SCHLEIFER^{19,28}, verifica-se que os *S. cohnii* utilizam a sacarose em 88% das cepas, enquanto os *S. xylosus*, *S. sciuri* e *S. epidermidis* reduzem nitrato a nitrito em 100, 80 e 80% das cepas, respectivamente. Portanto, o presente estudo teve por objetivo a formulação de um meio de cultura simples, que pudesse identificar rápida e presuntivamente as cepas de *S. saprophyticus*. O meio de cultura NNS foi composto baseado não somente na capacidade deste microorganismo de crescer na presença de 5 mcg/ml de novobiocina, mas também na sua capacidade de utilizar o carboidrato sacarose e na sua incapacidade em reduzir o nitrato²⁸, características estas que permitem uma diferenciação mais precisa entre os demais ECN.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas bacterianas — As 74 cepas de ECN estudadas foram isoladas de amostras de urina com contagens superiores a $1,0 \times 10^5$ organismos/ml, na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz-SP. Foram também utilizadas 12 cepas de referência (*S. aureus*, *S. xylosus*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri sciuri*, *S. sciuri lentus*), gentilmente cedidas pelo Dr. W. E. KLOOS, da Universidade do Estado da Carolina do Norte, USA. As cepas de referência foram mantidas no estado liofilizado a +4°C, e as cepas isoladas foram mantidas à temperatura ambiente em meio sólido de conservação¹⁶.

Meio NNS — O meio de cultura NNS foi composto de extrato de carne 0,1%; proteose peptona nº 3, 1%; cloreto de sódio, 0,5%; púrpura de bromocresol, 0,002%, pH 6,8; acrescido de 0,5% de nitrato de potássio e esterilizado por autocla-

vação a 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento foram adicionadas a sacarose (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) e a novobiocina (Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda. (CECON), São Paulo, SP, Brasil) nas concentrações finais de 1% e 5 mcg/ml, respectivamente. As soluções estoques de novobiocina e sacarose foram esterilizadas por filtração em membranas Millipore de 0,45 e 0,22 µ. O meio foi distribuído em alíquotas de 5 ml em tubos de 12 x 120 mm, com tampas de rosca, e sua esterilidade foi testada a 37°C por 48 horas. O meio NNS foi conservado a 4°C.

O inóculo foi constituído de 0,1 ml de uma suspensão bacteriana, feita em água destilada estéril a partir de uma cultura pura de 24 horas em ágar simples inclinado. Esta suspensão correspondeu à turbidez do tubo nº 2 da escala de McFarland, tendo portanto uma densidade aproximada de 6×10^8 cel/ml. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C e as leituras foram efetuadas após 24 horas pela verificação do crescimento bacteriano (turvação do meio). A utilização da sacarose foi indicada pela viragem do indicador de pH, e a redução de nitrato pela adição dos reativos de Griss, segundo método descrito por COWAN & STEEL⁷. Nos casos em que não houve crescimento bacteriano, as cepas foram reincubadas por mais dois dias, em estufa, a 37°C.

Caracterização das cepas de ECN ao nível de espécie — As 74 cepas de ECN foram caracterizadas ao nível de espécie, assim como as cepas de referência, tomadas como controle, através da maioria das provas preconizadas por KLOOS & SCHLEIFER, e outras cujas referências bibliográficas serão citadas na oportunidade.

A partir de uma cultura pura de 24 horas em ágar P inclinado¹⁷, foram efetuados testes para a verificação de: morfologia das colônias e presença de pigmento em placas de ágar P¹⁷; comportamento em relação ao oxigênio^{16,27}; presença de enzima catalase em teste de lâmina, segundo técnica citada por MAC FADDIN²²; presença de citocromo C oxidase^{5,27}; habilidade em utilizar a glicose aeróbica e anaerobicamente¹⁶; produção aeróbica de ácido a partir do glicerol em presença de 0,4 mcg/ml de eritromicina em ágar púrpura de bromocresol²⁹; susceptibilidade à lisostafina (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo, USA) nas concentrações de 200 mcg/ml e 50 mcg/ml²⁸; atividade de coagulase livre e ligada em plasma de coelho^{23,2}; presença de desoxirribonuclease termossensível em ágar DNA⁸; susceptibilidade a 1,6 mcg/ml de novobiocina pelo método em placa de ágar P²⁸; redução de nitrato a nitrito^{7,17}; hidrólise da uréia em meio uréia-indol⁸; hemólise em ágar sangue de carneiro (5% de sangue desfibrinado em ágar P)¹⁸; verificação de produção aeróbica de

ácido a partir de carboidratos (maltose, sacarose, trealose, manose, xilose e manitol)¹⁸.

Análise dos dados - Para análise da capacidade do meio NNS em diferenciar *S. saprophyticus* dos outros ECN, um resultado positivo verdadeiro foi classificado como uma cepa de *S. saprophyticus*, aquela capaz de crescer no meio NNS, após incubação de 24 horas em estufa a 37°C, produzir ácido a partir da sacarose e não reduzir o nitrato a nitrito. Um resultado negativo verdadeiro foi classificado como uma cepa de ECN não *S. saprophyticus*, que não cresceu no meio NNS, ou que, embora resistente a 5 mcg/ml de novobiocina, foi incapaz de utilizar a sacarose, podendo ou não reduzir o nitrato a nitrito; ou, ainda, que cresceu no meio NNS, utilizou a sacarose, mas apresentou redução de nitrato positiva. Os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos de resultados positivo e negativo e eficiência foram calculados de acordo com GALEN et alii¹⁹.

Susceptibilidade microbiana - O teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos foi realizado segundo a técnica de BAUER et alii⁴, onde foram utilizados discos impregnados com quimioterápicos (Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda. (CECON), São Paulo, SP, Brasil), nas seguintes concentrações: amicacina, 30 mcg; ampicilina, 30 mcg; canamicina, 30 mcg; cafalotina, 30 mcg; cefoxitina, 30 mcg; cloranfenicol, 30 mcg; eritromicina, 15 mcg; estreptomomicina, 10 mcg; gentamicina, 10 mcg; lincomicina, 2 mcg; novobiocina, 30 mcg; oxacilina, 1 mcg; penicilina, 10 mcg; sulfamethoxazol-trimethoprim, 25 mcg; tetraciclina, 30 mcg; vancomicina, 30 mcg.

RESULTADOS

O meio de cultura NNS foi inicialmente testado com as 12 cepas de referência de *Staphylococcus*, tendo os resultados sido referidos na tabela 1. Usando-se o critério de um resultado positivo no meio NNS, como sendo a presença de crescimento bacteriano, utilização da sacarose e ausência da enzima nitrato redutase após 24 horas de incubação a 37°C, pudemos caracterizar presuntivamente os *S. saprophyticus* entre as 74 cepas de ECN, com um valor preditivo de resultado positivo de 100%. O valor preditivo na diferenciação das cepas de ECN, não pertencentes a espécie *S. saprophyticus* (valor preditivo de resultado negativo), foi de 92,6%. A sensibilidade deste meio foi de 95,9% e sua especificidade e eficiência foram de 100 e 97,2%, respectivamente. Duas cepas de *S. saprophyticus* não utilizaram a sacarose no meio NNS após 24 horas de incubação, tendo sido consideradas como fal-

TABELA 1

Comportamento das cepas de referência de *Staphylococcus* frente ao meio NNS

Espécie	Meio NNS		
	Crescimento (turvação)	Utilização de sacarose	Redução de nitrato
<i>S. aureus</i>	-		
<i>S. epidermidis</i>	-		
<i>S. saprophyticus</i>	+	+	-
<i>S. simulans</i>	-		
<i>S. hominis</i>	-		
<i>S. haemolyticus</i>	-		
<i>S. warneri</i>	-		
<i>S. capitis</i>	-		
<i>S. xylosus</i>	+	+	+
<i>S. cohnii</i>	+	-	-
<i>S. sciuri sciuri</i>	-		
<i>S. sciuri lentus</i>	-		

+ Teste positivo

- Teste negativo

so-negativas (presuntivamente *S. cohnii*), o que contribuiu para a diminuição de alguns valores acima citados. Estas cepas utilizaram a sacarose após reincubação por mais 24 horas em estufa a 37°C. Entre os ECN estudados, com exceção feita aos *S. saprophyticus*, apenas 2 cepas de *S. haemolyticus* apresentaram crescimento no meio NNS, sendo que ambas não utilizaram a sacarose após 48 horas de incubação, mas reduziram nitratos a nitritos. Estas cepas foram classificadas como negativas verdadeiras e suas resistências à novobiocina foram posteriormente confirmadas pelos respectivos antibiogramas.

As 74 cepas de ECN foram diferenciadas do gênero *Micrococcus* pela produção aeróbica de ácido a partir do glicerol, em presença de 0,4 mcg por ml de eritromicina (95,9%), pela utilização da glicose aeróbica e anaerobicamente (100%), pelo comportamento aeróbico-anaeróbico facultativo (95,9%), e pela sensibilidade à lisostafina na concentração de 200 mcg/ml (78,4%). As espécies de ECN que caracteristicamente produzem pequenas quantidades de ácidos em consequência do metabolismo fermentativo da glicose, tais como *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, apresentaram reações fracas de acidificação no meio STAPH-MEVAG¹⁶. O sistema utilizado na identificação dos ECN ao nível de espécie permitiu a caracterização de 49 (66,2%) cepas de *S. saprophyticus*, 10 (13,5%) cepas de *S. simulans*, 6 (8,1%) de *S. epidermidis*, 4 (5,4%)

TABELA 2

Características morfológicas, bioquímicas e de resistência das 49 cepas de *S. saprophyticus* isoladas de culturas de urina

Características	Comportamento	%
Tamanho da colônia (diâmetro 5mm)	+	89,8
Catalase	+	100,0
Oxidase	-	100,0
Comportamento frente ao O ₂	AAF	100,0
Utilização aeróbica e anaeróbica da glicose (% de fermentação)	(+)/+	89,8/10,2
Utilização aeróbica do glicerol em presença de eritromicina (0,4 mcg/ml)	+	100,0
Susceptibilidade à lisostafina (200 mcg/ml)	+	77,5
Susceptibilidade à lisostafina (50 mcg/ml)	-	77,6
Coagulase livre	-	100,0
Coagulase ligada	-	100,0
Desoxirribonuclease termo sensível	-(+)	95,9/4,1
Resistência à novobiocina (1,6 mcg/ml)	+	100,0
Redução de nitrato	-	100,0
Urease	+*	100,0
Pigmento	+**	73,5
Hemólise (sangue de carneiro)	-	100,0
Produção aeróbica de ácido a partir de:		
Maltose	+	100,0
Trealose	+	100,0
Sacarose	+	100,0
Manose	-	100,0
Xilose	-	100,0
Manitol	+	100,0

Símbolos: + Teste positivo
 - Teste negativo
 (+) Teste positivo fraco
 AAF Aeróbio-anaeróbio facultativo
 * Reação imediata
 ** Pigmento amarelo

cepas de *S. haemolyticus* e 4 (5,4%) cepas de *S. hominis*. Uma cepa apresentou características que impossibilitaram sua classificação dentre as espécies de ECN até agora descritas. Oito cepas comprovadamente não pertencentes às espécies *S. epidermidis* (trealose positivas) e *S. saprophyticus* (sensíveis à novobiocina) apresentaram perfis bioquímicos que não corresponderam exatamente aos descritos por KLOOS & SCHLEIFER¹⁸, no que diz respeito à utilização da maltose, manose e manitol. Para estes casos foi utilizado o critério de classificação de NICOLLE et alii²⁵, onde as cepas manitol negativas e maltose positivas foram classificadas como *S. hominis* e aquelas manitol e maltose negativas, mas manose positivas, foram classificadas como *S. simulans*. Por outro lado, todas as cepas de *S. saprophyticus* apresentaram um perfil funcional bastante característico (tabela 2).

Das 49 cepas de *S. saprophyticus*, 47(95,9%)

TABELA 3

Sexo e faixa etária dos pacientes portadores de *Staphylococcus saprophyticus* na urina

Faixa etária anos	SEXO			
	Feminino		Masculino	
	Nº	%	Nº	%
0-5	3	6,12		
17-35	34	69,39		
36-35	5	10,21		
>45	1	2,04	1	2,04
i.d.*	4	8,16	1	2,04
Total	47		2	

*i.d. =idade desconhecida

foram isoladas de urina de mulheres não hospitalizadas, e duas foram provenientes de pacientes do sexo masculino. A faixa etária predominante das mulheres foi de 17 a 35 anos, conforme visto na tabela 3.

Os perfis de resistência aos quimioterápicos das diferentes espécies de ECN estão relacionados a seguir: 46 (93,88%) cepas de *S. saprophyticus* foram resistentes à novobiocina, enquanto 2 (50%) cepas de *S. haemolyticus*, multirresistentes, apresentaram igualmente resistência a esta droga. Quatro (66,66%) cepas de *S. epidermidis*, 3 (75%) cepas de *S. haemolyticus*, 2(20%) cepas de *S. simulans*, 3 (6,12%) de *S. saprophyticus* foram simultaneamente resistentes aos antibióticos penicilina e ampicilina. Não foram efetuados testes de detecção da enzima beta-lactamase. Uma resistência significativa à oxacilina foi observada entre as cepas de *S. haemolyticus* (75%), *S. saprophyticus* (46,94%) e *S. hominis* (25%), o mesmo não sendo verificado em relação à espécie *S. epidermidis*. Entretanto, todas as cepas testadas foram sensíveis às cefalosporinas (cefalotina e cefoxitina).

DISCUSSÃO

Pela análise da tabela 1, pudemos verificar que o meio de cultura NNS apresentou o comportamento previsto em relação às cepas de referência de *Staphylococcus*, uma vez que o mesmo impediu o crescimento das espécies sensíveis à novobiocina, sendo que as espécies resistentes utilizaram a sacarose e/ou reduziram nitratos, em conformidade com as características bioquímicas inerentes a cada espécie.

Os valores preditivos de resultados positivo e negativo, sensibilidade, especificidade e eficiência do meio NNS na diferenciação das cepas de *S. saprophyticus* dos demais ECN mostraram-se bastante satisfatórios. STEVENS²¹, utilizou um meio de cultura sólido (TMPA) contendo trealose, manitol e reagentes necessários à pesquisa da enzima fosfatase, associado ao teste de resistência à novobiocina pela utilização de discos impregnados com 5 mcg deste antibiótico. Os valores preditivos de resultados positivos e negativos encontrados foram de 83,9 e 100%, respectivamente, a sensibilidade e especificidade de 100% e 97,1%, respectivamente. NICOLLE²⁵ utilizou apenas a resistência à novobiocina (disco com 5 mcg de novobiocina) no diagnóstico presuntivo de *S. saprophyticus* isolados de urina, obtendo um valor preditivo de resultado positivo, na sua diferenciação dos demais ECN de 83%, sensibilidade de 100% e especificidade de 96%. PICKETT²⁶ utilizou o test "spot" em papel de filtro, de colônias provenientes de ágar sangue contendo

difosfato de fenoltaleína, com o objetivo de detectar colônias de estafilococos fosfatase negativos. Este teste conjugado ao teste de resistência à novobiocina (discos impregnados com 5 mcg de novobiocina) possibilitou uma triagem dos *S. saprophyticus* isolados de urina, com um valor preditivo de 87,5%. Através de uma análise comparativa, pudemos verificar que o meio NNS apresentou valores estatísticos semelhantes aos demais acima relacionados, além de ser um meio de cultura que permitiu a avaliação direta da resistência à novobiocina, sem a necessidade do uso adicional de teste de resistência, pela utilização de discos impregnados com este antibiótico.

Embora não tenham sido encontradas cepas de *S. cohnii* e *S. xyloso* entre as 74 cepas de ECN, pudemos diferenciar 2 cepas de *S. haemolyticus* resistentes à novobiocina, as quais teriam sido erroneamente diagnosticadas como *S. saprophyticus*, se houvesse sido utilizado um diagnóstico presuntivo baseado exclusivamente na resistência à novobiocina. Por outro lado, mesmo os testes para verificação da utilização da trealose, manitol e presença da enzima fosfatase não teriam sido suficientes para diferenciar estas duas espécies¹⁸. Ambas as cepas não utilizaram a sacarose no meio NNS (pelo sistema de identificação ao nível de espécie foram sacarose positivas), mas reduziram nitrato, o que possibilitou a diferenciação com o *S. saprophyticus*.

A respeito da utilização da sacarose no meio NNS, pudemos verificar que algumas cepas de *S. saprophyticus* apresentaram uma reação mais lenta, o que nos pareceu justificável pelo fato de o meio NNS ser um meio de cultura líquido, portanto com menor capacidade de detectar ácidos produzidos a partir de um metabolismo preferencialmente oxidativo, exibido por esta espécie. Os tubos de cultura que apresentaram uma modificação na cor púrpura do meio original para uma cor próxima do amarelo (denotando uma reação de acidificação), após 24 horas de incubação, foram considerados positivos, mesmo que a viragem completa de pH tenha ocorrido em 48 horas de incubação.

A estabilidade do meio NNS foi determinada pela análise do seu comportamento em relação às cepas de referência. O meio NNS, quando mantido à temperatura de 4° C, manteve suas características inalteradas por um período de 3 meses.

Neste estudo, pudemos verificar que a maioria das espécies de ECN isoladas das amostras significativas de urina (1,0 10⁵ colônias/ml) foram representadas pelos *S. saprophyticus* seguidos dos *S. simulans* e *S. epidermidis*. Estes resultados aparentemente divergiram de maneira significativa dos encontrados por alguns auto-

res^{11,23,25,26}, onde os *S. epidermidis* representaram os isolados mais frequentes de urina (70,8% aproximadamente) seguidos dos *S. saprophyticus* (15% aproximadamente), *S. haemolyticus* (6%) e *S. simulans* (4,8%). Entretanto, acreditamos que os nossos resultados foram perfeitamente compatíveis, uma vez que todas as nossas cepas foram isoladas de pacientes encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz, pelos Centros de Saúde do Município de São Paulo, contrariamente a grande parte das cepas referidas em outros estudos, provenientes de pacientes hospitalizados. Os *S. epidermidis*, e outros ECN isolados de pacientes internados em hospitais, estão mais provavelmente relacionados à ocorrência de infecções

hospitalares ou à maior susceptibilidade de pacientes imuno deprimidos aos patógenos oportunistas^{23,26}. Por outro lado, o achado da predominância de *S. saprophyticus* em amostras de pacientes femininas jovens, não hospitalizadas, com sintomatologia clínica das vias urinárias, esteve perfeitamente de acordo com os resultados obtidos anteriormente^{1,12,25,26}.

Agradecimentos

Agradecemos ao Sr. Dr. Augusto de Escagnole Taunay e à Srta. Kinue Irino, pela valiosa orientação recebida na elaboração deste trabalho.

RIALA6/670

TONDELLA, M.L.C.; SACCHI, C.T.; BUSCHINELLI, S.S.O.; CASA-GRANDE, S.T.; BRANDILEONE, M.C.C. & MILAGRES, L.G. - Use of NNS (Novobiocin-Nitrate-Sucrose) medium to differentiate *Staphylococcus saprophyticus* from other coagulase-negative staphylococci. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):137-143, 1989.

ABSTRACT: Using the NNS medium, a simple base medium containing potassium nitrate, sucrose and novobiocin, we differentiated *Staphylococcus saprophyticus* isolated from urine specimens from other coagulase negative staphylococci, with a positive predicative value of 100%, sensitivity of 95,9%, specificity of 100% and efficiency of 97,2%. *Staphylococcus saprophyticus* has been differentiated from the other species by its resistance to novobiocin, but three other coagulase-negative staphylococcal species (*Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus sciuri*) are also novobiocin resistant. *Staphylococcus cohnii* fails to utilize the carbohydrate sucrose in 88% of strains and *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus sciuri* reduce nitrate in 100 and 80% of strains, respectively. These features were used in the formulation of this differential medium, which is not based exclusively on the resistance to novobiocin of *Staphylococcus saprophyticus* strains, but also on its capacity to utilize the carbohydrate sucrose and its lack of the nitrate reduction activity. Reference strains of *Staphylococcus* species were used to test the NNS medium.

DESCRIPTORS: *Staphylococcus saprophyticus*; coagulase-negative staphylococci, urinary tract infections; novobiocin resistance.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, J.D.; CLARKE, A.M.; ANDERSON, M.E.; ISAAC RENTON, J.L., & McLOUGHLIN, M.G. - Urinary tract infection due to *Staphylococcus saprophyticus* biotype 3. *Can. med. Assoc. J.*; 124: 415-8, 1981.
2. BAILLEY, R.R. - Significance of coagulase negative *Staphylococcus* in urine. *J. infect. Dis.*, 127: 179-82, 1973.
3. BAILEY, W.R. & SCOTT, E.G. - *Diagnostic microbiology*. St. Louis, C.V. Mosby Co.; 1966.
4. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. clin. Pathol.*, 45: 493-6, 1966.
5. CARPENTER, C.M.; SUHRLAND, L.G. & MORRISON, M. - The oxalate salt of p-aminodimethylamine, an improved reagent for the oxidase test. *Science*, 1105: 649, 1947.
6. CRISTENSEN, G.D.; PARISI, J.T.; BISNO, A.L.; SIMPSON, W.A. & BEACHEY, E.H. - Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J. clin. Microbiol.*, 18: 258-69, 1983.
7. COWAN, S.T. & STEEL, K.J. - *Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press, 1975. p. 167.
8. DIFCO LABORATORIES - *Difco manual: medios de cultura deshidratados y reacciones para microbiología*. 10ª ed. Detroit, Mich., Difco, 1984. p. 263.
9. FLEURETTE, J. & BRUN, Y. - Rôle en pathologie humaine de *Staphylococcus epidermidis*. *etude de*

- 120 souches isolées des 53 malades. *Med. Mal. infect.*, 2:299-308, 1972.
10. GALEN, R.S. & GAMBINO, S.R. - *Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnoses*. New York, John Wiley, 1975. p. 115-6.
 11. GILL, V.J.; SELEPAK, S.T. & WILLIAMS, E.C. - Species identification and antibiotic susceptibilities of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical specimens. *J. clin. Microbiol.*, 18(6):1314-9, 1983.
 12. GILLESPIE, W.A.; SELLIN, M.; GILL, P.; STEPHENS, M.; TUCKWELL, L.A. & HILTON, A.L. - Urinary tract infections in young women with special reference to *Staphylococcus saprophyticus*. *J. clin. Pathol.*, 31.
 13. GOLDSTEIN, J.; SCHULMAN, R.; KELLEY, E.; MCKINLEY, G. & FUNG, J. - Effect of different media on determination of novobiocin resistance for differentiation of coagulase-negative staphylococci. *J. clin. Microbiol.*; 18:592-5 1983.
 14. HEBERT, G.A.; COOKSEY, R.C.; CLARK N.C.; HILL, B.C.; JARVIS, W.R. & THORNSBERRY, C. - Biotyping coagulase negative staphylococci. *J. clin. Microbiol.*, 26(10):1950-6, 1988.
 15. HEBERT, G.A.; CROWDER, C.G.; HANCOCK, G.A.; JARVIS, W.R. & THORNSBERRY, C. - Characteristics of coagulase-negative that help differentiate these species and other members of the family *Micrococcaceae*. *J. clin. Microbiol.*, 26(10):1939-49, 1988.
 16. INSTITUT PASTEUR - *Milieux et Réactifs de Laboratoire Pasteur*. Paris, Inst. Pasteur, 1978. p. 120, 141, 186.
 17. KLOOS, W.E.; TORNABENET, G. & SCHLEIFER, K.H. - Isolation and characterization of micrococci from human skin, including two new species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae*. *Int. J. syst. Bacteriol.*; 24(1):79-101, 1974.
 18. KLOOS, W.E. & SCHLEIFER, K.H. - Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J. clin. Microbiol.*, 1(1): 82-8, 1975.
 19. KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. & SMITH R.F. - Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov and its subspecies. *Int. J. syst. Bacteriol.*; 26(1) 22-37, 1976.
 20. KLOOS, W.E. & WOLFSHOHL, J.F. - Identification of *Staphylococcus* species with the API STAPH-IDENT system. *J. clin. Microbiol.*; 16(3):509-16, 1982.
 21. LAVERDIERE, M.; PETERSON, P.K.; VERHOEF, J.; WILLIAMS, D.N. & SABATH L.D. - In vitro activity of cephalosporins against methicillin resistant, coagulase negative staphylococci. *J. infect. Dis.*, 137:245-50, 1978.
 22. MAC FADDIN, J.F. - *Biochemical test for identification of medical bacteria 2 ND*, Baltimore & WILKINS, 1980. p. 51-8.
 23. MARRIE, T.J.; KWAN, C.; MOBLE, M.A.; WEST, A. & DUFFIELD, I. - *Staphylococcus saprophyticus* as a cause of urinary tract infections *J. clin. Microbiol.*, 16(3):427-31, 1982.
 24. MENDES, C.M.F.; GOES SIQUEIRA, L.F. & FRANCISCO, W. - Rapid automated identification of novobiocin resistant, coagulase-negative staphylococci. *J. clin. Microbiol.*, 22(2):316-7, 1987.
 25. NICOLLE, L.E.; HOBAN, S.A. & HARDING, G.K.M. - Characterization of coagulase-negative staphylococci from urinary tract specimens. *J. clin. Microbiol.* 17(2):267-71, 1983.
 26. PICKETT, D.A. & WELCH, D.F. - Recognition of *Staphylococcus saprophyticus* in urine cultures by screening colonies for production of phosphatase. *J. clin. Microbiol.*, 21(3):310-3, 1985.
 27. SACCHI, C.T.; TONDELLA, M.L.C.; BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A. & PAULA, M.D.N. - *Corynebacterium diphtheriae* isolada de sangue. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):73-9, 1985.
 28. SCHLEIFER, K.H. & KLOOS, W.E. - Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended description of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosus*. *Int. J. syst. Bacteriol.*, 25:50-61, 1975.
 29. SCHLEIFER, K.H. & KLOOS, W.E. - A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci. *J. clin. Microbiol.*, 1(3):337-8, 1975.
 30. SEWELL, C.M.; CLARRIDGE, J.E.; YOUNG, E.J.; & GUTHRIE, R.K. - Clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *J. clin. Microbiol.*, 16:236-9, 1982.
 31. STEVENS, D.L.; JONES, C. - Use of trealose-manitol-phosphatase agar to differentiate *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* from other coagulase-negative *Staphylococcus*. *J. clin. Microbiol.* 20(5):977-80, 1984.
 32. Subcommittee on taxonomy of staphylococci and micrococci recommendation. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl.*, 15:109-10, 1965.
 33. WILKINSON, B.J.; MAXWELL, S. & SCHAUS, S.M. - Classification and characteristics of coagulase-negative, methicillin-resistant staphylococci. *J. clin. Microbiol.*, 12:161-6, 1980.

Recebido para publicação em 10 de março de 1989

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ADULTERANTES DO ÓLEO DE DENDÊ POR MEIO DE CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA*

Mário TAVARES**
José Carlos BARBÉRIO***
Eliza S. Gastaldo BADOLATO**
Franca Durante de MAIO**
José Byron de CARVALHO**

RIALA6/671

TAVARES, M.; BARBÉRIO, J. C.; BADOLATO, E. S. G.; MAIO, F. D. & CARVALHO, J. B. — Identificação e quantificação de adulterantes do óleo de dendê por meio de cromatografia em fase gasosa. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):145-150, 1989

RESUMO: A fim de determinar a composição em ácidos graxos de possíveis misturas contendo azeite de dendê e óleo de soja, foram analisadas 100 amostras, utilizando-se técnica de cromatografia em fase gasosa. Foram também determinados os índices de iodo e de refração de todas as amostras. A partir da composição média em ácidos palmítico e linoléico dos óleos de dendê e de soja brasileiros, foi possível estabelecer equações para o cálculo da quantidade aproximada de óleo de soja adicionado com fins de adulteração. A técnica cromatográfica permitiu verificar que 26 de 99 amostras estavam adulteradas e uma — registrada como óleo misto —, em desacordo com a fórmula declarada no rótulo. A incidência da adição de óleo de soja no azeite de dendê variou de 21 a 79%, havendo entre as adulteradas 14 amostras que continham mais de 50% do referido óleo. Os índices de iodo e de refração serviram apenas como referenciais na composição do azeite de dendê. Com base nos dados experimentais obtidos, recomenda-se a inclusão na legislação brasileira da composição em ácidos graxos dos óleos e gorduras comestíveis — por exemplo, o de dendê—, como medida para possível identificação de adulteração.

DESCRITORES: azeite de dendê ou óleo de dendê ou óleo de palma, adulteração; cromatografia em fase gasosa; índice de iodo e índice de refração.

INTRODUÇÃO

A adulteração dos óleos e gorduras comestíveis tem sido um problema há muito tempo reportado^{8,10,11}. As vezes é deliberada, outras vezes acidental.

Algumas ocorrências de adulterações de óleos comestíveis, principalmente azeite de oliva, têm sido relatadas nos últimos anos^{1,8,12,14}, sendo óleo de soja o preferido nas adições intencionais,

obviamente por causa de seu preço inferior ao dos demais, como consequência de sua produção em larga escala¹⁶.

Com relação ao óleo ou azeite de dendê, conhecido internacionalmente como óleo de palma, a literatura não informa sobre constatações de adulterações que possa ter sofrido. Entretanto, o Instituto Adolfo Lutz, da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, vem constatando uma certa incidência, de alguns anos para cá, a despeito do

* Realizado na Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos e no Laboratório da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Parte da dissertação de mestrado apresentada pelo primeiro autor, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, em 22/9/88. Apresentado no 5º Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, Salvador, BA, 1989.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

pequeno número de amostras colhidas pela fiscalização para análise de rotina naquele órgão governamental.

Entre as técnicas desenvolvidas e empregadas para detectar e até quantificar adulterantes de óleos e gorduras, a cromatografia em fase gasosa foi a que apresentou os melhores resultados^{1,12,14,16}, substituindo, conseqüentemente, os métodos clássicos, como os índices de iodo e refração. Estes não permitem, às vezes, que seja constatada a mistura de óleos e, muito menos, as proporções em que foram realizadas as adulterações. Contudo, a legislação brasileira vigente² não inclui a composição em ácidos graxos, determinada através da cromatografia em fase gasosa, nas normas relativas aos óleos e gorduras destinados à alimentação humana.

O presente trabalho teve como objetivos estabelecer, a partir da composição em ácidos graxos, método para quantificar fraudes por adulteração em óleos de dendê e, com base nos resultados obtidos, propor à legislação brasileira a inclusão da composição em ácidos graxos nas normas referentes aos padrões de identidade e qualidade de óleos e gorduras comestíveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o ano de 1987, foram coletadas e analisadas 100 amostras, selecionadas entre aquelas comercializadas em cidades brasileiras, assim divididas:

a) 49 rotuladas com azeite de dendê, com marca registrada, codificadas por letras do alfabeto, coletadas nas cidades de Itanhaém, Osasco, Santos, São Paulo e São Vicente (SP), João Pessoa (PB), Salvador (BA), Recife (PE), Aracaju (SE), Natal (RN), Salinas (MG), além de Brasília (DF);

b) 1 rotulada como óleo misto — 60% de dendê e 40% de soja —, codificada como A-7, coletada pela fiscalização para fins de registro;

c) 36 comercializadas como azeite de dendê, sem rótulo, em feiras livres ou mercados municipais de Salvador, Cachoeira, Ubaitaba e Valença (BA), Maceió (AL), Salinas (MG) e João Pessoa (PB);

d) 7 referidas como azeite de dendê, sem rótulo, produzidas e engarrafadas por fazendeiros que ainda empregam o processo rudimentar do "rodão", nas cidades de Ubaitaba, São Felipe e Valença (BA) e Ilha das Flores (SE);

e) 7 oriundas do pré-engarrafamento do azeite

de dendê, cedidas pelas próprias empresas, localizadas em Santos, São Paulo (SP) e Belo Horizonte (MG).

Foram ainda simuladas 11 misturas em laboratório, para obtenção de perfis cromatográficos. Foi selecionada uma amostra de azeite de dendê, cuja composição em ácidos graxos e os índices de iodo e de refração fossem mais aproximados dos valores médios encontrados nas amostras puras da parte experimental, e uma amostra de óleo de soja que apresentasse os referidos dados próximos à média de 18 unidades puras, brasileiras, analisadas por SZPIZ et alii¹⁴. A seguir, ao azeite de dendê foram adicionadas 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 95 partes de óleo de soja.

Tratamento prévio das amostras de azeite de dendê

Em face de seu elevado teor de ácidos graxos saturados, sobretudo o palmítico^{6,7,9}, o azeite de dendê normalmente apresenta sedimentos. Sendo assim, a amostra foi homogeneizada, antes de cada análise, por meio de fusão, em banho-maria, seguido de filtração.

Determinação da composição em ácidos graxos

A análise dos ácidos graxos foi efetuada por cromatografia em fase gasosa dos ésteres metílicos. O processo empregado para metilação foi o de transesterificação, segundo as *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*⁵. Utilizou-se de cromatógrafo a gás, com detector de ionização de chama, marca Varian, modelo 1400, acoplado a um integrador.

Os componentes foram separados em coluna de 6 pés de comprimento por 1/8 de polegada de diâmetro interno, empacotada com succinato de dietileno glicol (DEGS) a 10% em Chromosorb W.

A identificação dos ácidos graxos foi feita por comparação dos seus respectivos tempos de retenção com os de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos, com número de átomos de carbono variando de 12 a 20. As condições de operação foram sempre as mesmas.

A quantificação foi efetuada por normalização de área³, por meio de um integrador, marca Varian, modelo CDS-111, acoplado ao cromatógrafo.

Caracterização do óleo

Complementarmente, foram determinados em todas as amostras os índices de iodo (Método de Wijs) e de refração a 40°C. Utilizou-se, para as medidas do índice de refração, o refratômetro de Abbé.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Misturas simuladas: valores teóricos

A partir dos valores médios do somatório dos resultados das amostras consideradas puras, num total de 73, foi possível a elaboração de valores teóricos para a composição em ácidos graxos e índices de iodo e de refração, relativos às misturas de azeite de dendê e óleo de soja preparadas em laboratório. Todos esses valores encontram-se agrupados na tabela 1.

Identificação e quantificação do adulterante mais provável

Identificação — Na composição dos ácidos graxos do azeite de dendê puro, os seguintes ácidos são normalmente identificados: mirístico, palmítico, esteárico, oléico, linoléico, linolênico. Dependendo da origem do óleo e trabalhando com sensibilidade maior no cromatógrafo, podem ser detectados também o láurico, o palmitoléico, e o araquídico. No óleo de soja puro, são encontrados os ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico, sendo às vezes detectados o mirístico, o palmitoléico e o araquídico, quando se eleva a sensibilidade.

Quantificação — Pelos resultados obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que o azeite de dendê tem no ácido oléico o seu constituinte em maior porcentagem (média de 43,16%) dentre os ácidos graxos, enquanto para o óleo de soja, de

modo geral, o ácido graxo principal é o linoléico. Entretanto, o primeiro não poderia ser utilizado para quantificar adulterante do tipo do óleo de soja, pois a faixa aplicada pelo *Codex Alimentarius*^{4,13} para o ácido oléico, em ambos os óleos, é parcialmente coincidente.

Então, para quantificar a adulteração do óleo de dendê, após a identificação, foi estabelecido um sistema de duas equações com duas incógnitas, baseado nos teores médios de ácidos graxos, cujas quantidades são nitidamente modificadas pelo adulterante (óleo de soja), no caso o palmítico e o linoléico. Desta forma, partindo de valores médios obtidos de ambos os ácidos em óleo de dendê (38,99 e 11,98%, respectivamente) e em óleo de soja (11,54, e 54,31%, respectivamente), a quantidade de óleo de soja adicionada foi calculada através das seguintes equações:

$$\% \text{ de ácido palmítico na amostra} = 38,99x + 11,98y$$

$$\% \text{ de ácido linoléico na amostra} = 11,54x + 54,31y$$

Onde:

x = % de óleo de dendê na mistura, e

y = % de óleo de soja na mistura

Deve-se atentar para o fato de que as quantidades do adulterante calculadas pelas equações trazem consigo uma determinada porcentagem de in-

TABELA 1

Composição em ácidos graxos (peso %) e índices de iodo e de refração de misturas simuladas de óleo de dendê e óleo de soja brasileiros — valores teóricos

Misturas simuladas	Composição em ácidos graxos (%)									Índices	
	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	Iodo (Wijs)	Refração a 40°C
100%D	0,21	0,76	38,99	0,03	4,97	43,16	11,54	0,35	0,01	58,0	1,4587
95%D/5%S	0,20	0,72	37,64	0,03	4,92	42,16	13,68	0,65	0,01	61,6	1,4591
90%D/10%S	0,19	0,68	36,29	0,04	4,88	41,17	15,82	0,95	0,01	65,1	1,4595
80%D/20%S	0,17	0,61	33,59	0,04	4,78	39,17	20,09	1,54	0,01	72,2	1,4603
70%D/30%S	0,15	0,53	30,89	0,05	4,69	37,18	24,37	2,14	0,01	79,4	1,4612
60%D/40%S	0,13	0,46	28,19	0,05	4,59	35,18	28,65	2,74	0,01	86,5	1,4620
50%D/50%S	0,11	0,38	25,49	0,06	4,50	33,19	32,93	3,34	0,01	93,6	1,4628
40%D/60%S	0,08	0,30	22,78	0,06	4,41	31,19	37,20	3,93	-	100,7	1,4636
30%D/70%S	0,06	0,23	20,08	0,07	4,31	29,20	41,48	4,53	-	107,8	1,4644
20%D/80%S	0,04	0,15	17,38	0,07	4,22	27,20	45,76	5,13	-	115,0	1,4653
10%D/90%S	0,02	0,08	14,68	0,08	4,12	25,22	50,03	5,72	-	122,1	1,4661
5%D/95%S	0,01	0,04	13,33	0,08	4,08	24,21	52,17	6,02	-	125,6	1,4665
100%S	-	-	11,98	0,08	4,03	23,21	54,31	6,32	-	129,2	1,4669

D - óleo de dendê.

S - óleo de soja.

TABELA 2

Composição em ácidos graxos (peso %) e índices de iodo e de refração de amostras rotuladas como azeite de dendê, adulteradas com óleo de soja

Marca (Código)	Composição em ácidos graxos (%)									Óleo de soja (%)*	Índices	
	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0		Iodo (Wijs)	Refração a 40°C
A - 1	-	0,42	21,70	-	4,04	27,72	41,45	4,68	-	70	105,1	1,4641
A - 3	-	-	18,42	-	2,58	28,34	43,28	7,39	-	76	107,2	1,4653
A - 4	-	-	19,78	tr	4,16	25,35	41,33	9,37	-	71	105,1	1,4647
A - 5	0,21	0,34	25,83	-	3,54	30,85	35,87	3,35	-	56	99,1	1,4635
A - 6	0,33	0,45	19,67	-	3,84	29,66	40,44	5,61	tr	67	106,2	1,4640
A - 7	-	-	20,51	-	3,54	31,30	41,47	3,17	-	70	105,1	1,4650
B - 1	-	-	17,25	-	4,23	27,49	45,92	5,16	-	79	115,8	1,4660
B - 2	-	-	25,58	-	5,63	32,59	32,76	3,44	-	51	93,4	1,4631
B - 3	-	-	26,42	-	4,47	33,09	32,08	3,94	-	48	93,0	1,4626
B - 4	-	-	22,96	-	4,39	32,19	36,24	4,22	-	58	97,0	1,4635
B - 5	tr	0,81	31,95	0,22	5,08	37,81	22,04	2,10	-	26	78,5	1,4607
H - 2	-	23,65	-	4,01	32,13	37,26	2,87	-	-	61	102,1	1,4639
I - 1	0,95	0,78	29,37	-	4,07	35,13	27,52	2,18	-	37	84,8	1,4620
I - 3	-	1,12	28,44	-	4,09	30,22	33,52	2,61	-	49	93,4	1,4625
J - 1	-	0,35	20,97	-	4,15	29,39	40,56	3,99	-	68	104,1	1,4644
J - 2	-	0	27,91	-	4,55	38,12	27,31	2,01	-	38	88,9	1,4626
L - 1	-	0	34,93	-	5,74	35,40	22,40	1,52	-	25	78,0	1,4609
L - 2	-	0,66	33,35	-	5,30	41,04	18,58	1,07	-	21	76,0	1,4610
O - 1	0,20	0,45	24,77	tr	4,19	32,95	32,71	4,65	0,08	51	93,8	1,4635
Q - 1	0,09	0,30	20,23	-	3,76	26,59	43,19	5,83	-	74	110,7	1,4651
R - 1	-	0,43	31,76	-	5,45	38,79	21,82	1,45	0,30	24	74,7	1,4607
S - 1	-	1,11	19,84	-	2,53	25,92	44,22	6,37	-	74	111,2	1,4652
T - 1	-	0,28	26,51	-	3,75	26,69	35,72	4,05	-	55	99,6	1,4635

* Percentual aproximado

TABELA 3

Composição em ácidos graxos (peso %) e índices de iodo e de refração de amostras comercializadas como azeite de dendê, sem rótulo, adulteradas com óleo de soja

Amostra Nº	Composição em ácidos graxos (%)									Óleo de soja (%)*	Índices	
	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0		Iodo (Wijs)	Refração a 40°C
04	0,19	0,38	30,62	0,09	4,97	38,71	23,12	1,92	-	28	75,2	1,4608
18	0,19	0,70	33,28	0,08	4,29	36,86	22,59	2,01	-	24	75,2	1,4610
33	0,58	0,53	33,44	0,29	4,52	38,09	20,79	1,76	-	22	73,1	1,4604

* Percentual aproximado

certeza, que pode atingir a 10%, quando se trata de óleo de soja¹². Isso se deve, principalmente, aos fatores climáticos, edofológicos, tipo e grau de maturação dos frutos¹⁵, que influenciam na composição dos óleos vegetais, e não ao método da cromatografia em fase gasosa.

Amostras de óleo de dendê adulteradas

Incidência de adulterações — As tabelas 2, 3 e 4 apresentam a composição em ácidos graxos e os índices de iodo e de refração das amostras de óleo de dendê adulteradas — num total de 26 —

bem como o percentual aproximado de adulterante arroximado.

Pelos resultados obtidos, verificou-se que o óleo de soja, como era esperado, foi o único adulterante adicionado.

A maior incidência de casos de adulteração foi verificada com as amostras rotuladas como azeite de dendê, ou seja, 22 (44,9%) entre 49 analisadas, variando de 21 a 79% a quantidade aproximada de óleo de soja adicionado. Quanto às amostras comercializadas como óleo de dendê,

TABELA 4

Composição em ácidos graxos (peso %) e índices de iodo e de refração de amostra obtida do pré-engarraçamento de azeite de dendê, adulterado com óleo de soja

Marca (Código)	Composição em ácidos graxos (%)									óleo de soja (%)*	Índices	
	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0		Iodo (Wijs)	Refração a 40°C
A-8	-	0,66	31,39	-	4,84	38,05	22,87	2,18	-	28	78,2	1,4611

* Percentual aproximado

sem rótulo, apenas 3 (8,3%) entre 36 examinadas se revelaram adulteradas, com porcentagem de adição de óleo de soja de 22 a 28%, inferiores, portanto, à maior parte das rotuladas. No tocante às amostras obtidas do pré-engarraçamento do óleo de dendê, somente uma (14,3%) das 7 analisadas estava adulterada.

Com relação ao óleo de dendê produzido pelo processo "rodão", nenhuma adulteração foi registrada.

Quanto à amostra codificada como A-7, rotulada como óleo misto de dendê (60%) e de soja (40%), constatou-se que estava em desacordo com a mistura declarada, já que o teor aproximado de óleo de soja era de 70%.

Cabe ressaltar, quanto às 22 amostras adulteradas, rotuladas como azeite de dendê, assim como à do óleo misto, de mistura discordante da declarada no rótulo, que todas elas foram engarrafadas em cidades não pertencentes aos Estados da Bahia ou do Pará, os maiores produtores de óleo de dendê brasileiro. Em contrapartida, todas as amostras analisadas de óleos produzidos e engarrafados naqueles Estados estavam puras. Pode-se, mesmo, afirmar que a adulteração do óleo de dendê, geralmente, ocorre na etapa do engarraçamento, ou seja, no momento em que se fraciona o óleo a granel.

Tanto no caso das 26 amostras adulteradas, como na de óleo misto, a composição em ácidos graxos e os índices de iodo e de refração estavam dentro das faixas de valores teóricos para as respectivas misturas simuladas em laboratório, constantes na tabela 1. Os cromatogramas dos óleos adulterados, por seu turno, se assemelharam aos dos correspondentes perfis cromatográficos das misturas preparadas, com 20 a 80 partes de óleo de soja.

De acordo com os resultados obtidos, a adulteração de azeite de dendê, realizada apenas com óleo de soja, foi facilmente detectada pela determinação dos índices de iodo e de refração e por meio da cromatografia gasosa. Os primeiros tive-

ram seus valores aumentados, ficando fora dos intervalos característicos para óleo de dendê puro. E os ácidos graxos, principalmente o palmítico e o linoléico, exibiram uma variação acentuada na respectiva proporção relativa. Todavia, a identidade e a quantidade aproximada só foi capaz de ser obtida pela cromatografia. Aliás, com relação à cromatografia, de fato, a utilização de poliésteres, como o succinato de dietileno glicol, na fase estacionária, revelou-se eficiente na separação dos ácidos graxos característicos.

CONCLUSÕES

Utilizando-se cromatografia em fase gasosa, foi possível detectar adulterações do óleo de dendê brasileiro em porcentagens iguais ou superiores a 20% de óleo de soja.

De acordo com a composição média em ácidos palmítico e linoléico dos óleos de dendê e soja brasileiros, estabeleceu-se um sistema de duas equações com duas incógnitas, que permitiu quantificar, aproximadamente, as porcentagens de óleo de soja adicionado, com vistas à adulteração.

Verificou-se que, de 99 amostras de óleo de dendê analisadas, 26 (26,3%) estavam adulteradas, das quais 22 comercializadas a varejo (rotuladas).

A adulteração ocorreu, sistematicamente, com óleo de soja, variando sua proporção de 21 a 79%; entre as adulteradas, 14 amostras (53,8%) continham mais de 50% de óleo de soja.

Os índices de iodo e de refração não bastam para identificar ou quantificar adulterações em óleo de dendê, servindo apenas como referenciais na composição desse óleo.

Com base no presente trabalho, recomenda-se a inclusão da composição em ácidos graxos, nas normas brasileiras relativas à identidade e qualidade de óleos e gorduras comestíveis — por exemplo o de dendê —, como medida para possível identificação de adulteração.

RIALA6/671

TAVARES, M.; BARBÉRIO, J.C.; BADOLATO, E.S.G.; MAIO, F.D. & CARVALHO, J.B. — Gas-chromatographic identification and quantification of palm oil adulterants. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (2):145-150, 1989.

ABSTRACT: In order to determine the fatty acid composition of possible mixtures which contain palm oil and soybean oil, it was analysed one hundred samples, by the gas-chromatography technique. It was also determined the iodine number and the refraction index of all samples. From the medium composition on palmitic and linoleic acids of the Brazilian palm and soybean oils, it was possible to set equations to calculate the approximate quantity of soybean oil added with a adulteration purpose. The chromatographic technique allowed detection of 26 adulterated samples in 99 examined and one — registered as mixture oil — in disagreement with the declared formula on the label. The incidence of addition of soybean oil in the palm oil varied between 21 to 79%; among the adulterated samples, 14 contained more than 50% of soybean oil. The iodine number and the refraction index has served only as referentials in the palm oil composition. Considering the experimental data obtained, it's recommended the inclusion in the Brazilian legal standards of fatty acid composition, with respect to edible oils and fats — as the palm — as the measure for identification of a possible adulteration.

DESCRIPTORS: palm oil; foods fraud, adulteration; gas-chromatography, iodine number and refraction index.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BADOLATO, E.S.G.; DURANTE, F.; ALMEIDA, M.E.W.; SILVEIRA, N.V.V. — Óleo de oliva: avaliação de sua qualidade. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(1): 63-70, 1981.
2. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 22/77, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*. Brasília, 06 set. 1977. Sec.1, pt.1, p.11807-10. Estabelece padrão de identidade e qualidade para os óleos e gorduras comestíveis, destinados à alimentação humana.
3. CIOLA, R. Introdução à cromatografia. In: *Fundamentos da cromatografia a gás*. São Paulo, Edgard Blucher, 1985. 297p.
4. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. *Codex standards for edible fats and oils*. Rome. FAO/WHO, 1982. (CAC — vol. 11).
5. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*, 3ª ed. São Paulo, IMESP, 1985, v.1, p.245-66.
6. LAGO, R.C.A. *Estudo da composição, propriedades e transformações de óleo de dendê brasileiro*. Campinas, 1985. 155p. [Tese — Doutorado — Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da UNICAMP].
7. LAGO, R.C.A. & HARTMAN, L. *Composição de óleo de dendê brasileiro*. Rio de Janeiro, EMBRAPA-CTAA, 1987. 15p. (EMBRAPA-CTAA. Boletim de pesquisa, 14).
8. NASTRULLAH & NAGARAJA, K. V. Detection of the presence of toxic oils in edible vegetable oils, *Oléagineux*, 42(1):35-8, Jan. 1987.
9. PANDOLFO, C. *A cultura do dendê na Amazônia*, Belém, SUDAM, 1981. 35p.
10. ROSSELL, J. B.; KING, B.; DOWNES, M.J. Composition of oils *J. am. Oil Chem. Soc.*, 62(2):221-30, Feb. 1985.
11. ROSSELL, J.B.; KING, B. & DOWNES, M.J. Detection of adulteration. *J. am. Oil Chem. Soc.*, 60(2):333-9, Feb. 1983.
12. SOARES, L. V. & AMAYA, D.R. Identificação e quantificação de adulterantes em óleo de oliva por cromatografia gasosa *Bol. SBTCA*, Campinas 15 (1):1-17, jan./mar., 1981.
13. SOYBEANS around the world. *J. am. Oil Chem. Soc.*, 64(10): 1372, Oct. 1987.
14. SZPIZ, R.R.; PEREIRA, D. A.; JABLONKA, F.H. *Avaliação de óleos comestíveis comercializados no Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro, EMBRAPA-CTAA, 1985. 11 p. (EMBRAPA-CTAA. Boletim de pesquisa, 13).
15. TANGO J.S.; LACAZ, P.A.A.; SANTOS, L.C. dos; TURATTI, J. M. SILVA, M.T.C.; FIGUEIREDO, I.B. de; MANTOVANI, D.M.B.; CAMPOS, S.D. da S. de. — Características físicas e químicas do óleo de dendê. *Bol. ITAL*, Campinas, 18(4):509-42, out./dez. 1981.
16. VIDAL, P.A.; RICCIARDI, A.J.; FERREIRA, J.F. Determinação da adição de óleo de soja a outros óleos vegetais comestíveis por cromatografia em fase gasosa. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(1):67-77, jun. 1979.

Recebido para publicação em 16 de março de 1989.

ENCONTRO DE *Lutzomyia (Pintomyia) Damascenoi*, MANGABEIRA,
1941 (DIPTERA; PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE)
NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.

Helena Hilomi TANIGUCHI**
José Eduardo TOLEZANO**
Oswaldo Martinez D'ANDRADE**

RIALA6/672

TANIGUCHI, H.H.; TOLEZANO, J.E. & D'ANDRADE, O.M. — Encontro de *Lutzomyia (Pintomyia) damascenoi*, Mangabeira, 1941 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (2):151-153, 1989.

RESUMO: A partir de estudos sobre a composição da fauna flebotomínica em áreas endêmicas para Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, os autores relatam o encontro de um exemplar macho de *Lutzomyia (Pintomyia) damascenoi*, Mangabeira, 1941, coletado na Reserva Florestal do Morro do Diabo no Município de Teodoro Sampaio. O presente relato constitui o primeiro registro desta espécie flebotomínica em área localizada fora da Região Amazônica.

DESCRITORES: *Lutzomyia (Pintomyia) damascenoi*, distribuição geográfica, flebotomíneos, Leishmaniose Tegumentar Americana.

INTRODUÇÃO

Como parte de extensas investigações levadas a efeito em áreas endêmicas para Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado de São Paulo, os autores vêm efetuando coletas de flebotomíneos.

Tais atividades visam atender necessidades de conhecimento da fauna flebotomínica, assim como esclarecer o papel desempenhado por tais artrópodes em nosso meio.

O presente artigo tem por objetivo relatar o encontro de *Lutzomyia (Pintomyia) damascenoi* no Estado de São Paulo. Esta espécie de flebotomíneo, descrita por Mangabeira em 1941², tem sido caracterizada como restrita à área Amazônica, na região Norte do Brasil e na Colômbia, quanto a sua distribuição geográfica^{2,3}.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas coletas de flebotomíneos no mês de novembro de 1987 no Parque Estadual do Morro do Diabo, situado no Município de Teodoro Sampaio, no Estado de São Paulo (Latitude 22°27': a 22°40' Sul, Longitude 52°10' a 52°22' Greenwich). A vegetação é do tipo Floresta Subcaducifolia Tropical e se constitui numa formação intermediária entre as florestas perenes de encosta e as formações não florestais do interior.

Para a coleta dos flebotomíneos utilizou-se barraca de Shannon instalada próxima à margem de mata, tendo sido empregados como iscas, homem, roedor e luz concomitantemente. Os insetos foram coletados no período noturno, entre 20:00 e 24:00 horas, com capturador de Castro.

Todos os exemplares foram conservados em álcool a 70% até chegarem ao laboratório, quan-

* Realizada na Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

do, então, foram transferidos para a solução de potassa a 10%, ácido acético glacial, água destilada e solução de lactofenol, sucessivamente. Após essa bateria, foram montados entre lâmina e lamínula, individualmente, em líquido de Berlese, sendo então identificados, de acordo com as descrições morfológicas de FORATTINI¹ & MARTINS, WILLIAMS & FALCÃO⁴. Todavia, optou-se pela nomenclatura adotada por MARTINS, WILLIAMS & FALCÃO² por ser a de maior aceitação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi coletado um total de 1.036 flebótomos

com predomínio de exemplares fêmeas (88,6%). Após a identificação, constatou-se maior frequência de *Lutzomyia intermedia* (87,9%), seguida por *Lu. whitmani* (8,5%) e *Lu. pessoai* (2,9%); as demais espécies compreenderam 4 exemplares de *Lu. fischeri*, 2 de *Lu. shannoni* e 1 exemplar de *Lu. damascenoi*.

Ressalta-se a importância do encontro de *Lu. damascenoi* (fotos 1 e 2) em área do Estado de São Paulo. Esta espécie, até a presente data, tem tido sua distribuição geográfica restrita à região Amazônica^{3,4}, constituindo-se, portanto, o presente relato, no primeiro registro de sua presença em área da região Sudeste do país. O exem-

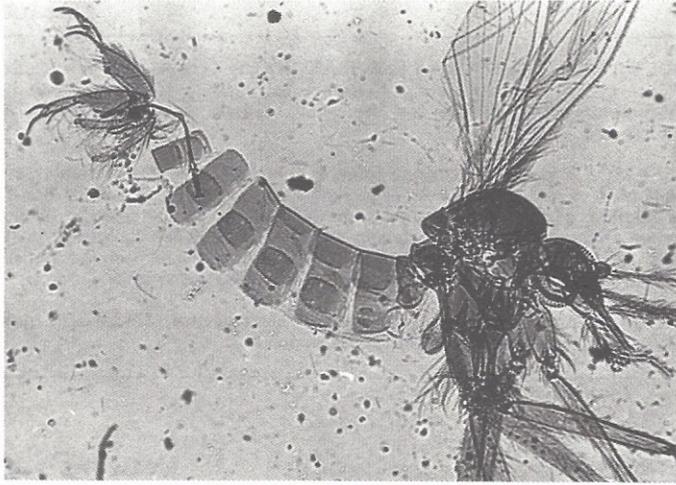


Figura 1 — *Lutzomyia (Pintomyia) damascenoi*.

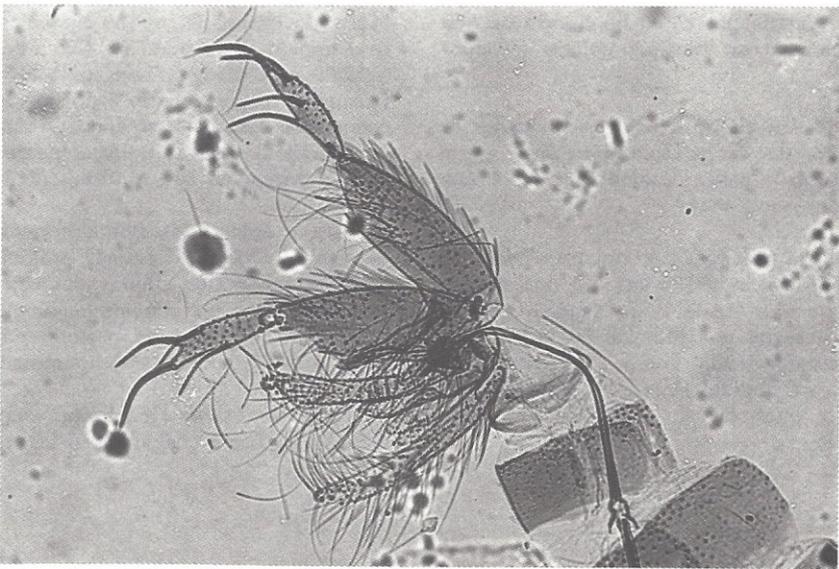


Figura 2 — Genitália de *Lutzomyia (Pintomyia) damascenoi*.

plar ora referido encontra-se depositado na Coleção de Flebotomíneos da Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz.

Os autores salientam a importância da continuidade de estudos visando o reconhecimento da fauna flebotomínea e o papel desempenhado por tais insetos na epidemiologia das Leishmanioses Tegumentares Americanas no Estado de São Paulo, uma vez que essas atividades possibilitam o fornecimento de subsídio para o reco-

hecimento da verdadeira distribuição geográfica e incriminação das espécies vetoras primárias e/ou principais de protozoários do gênero *Leishmania*.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Antonio Silva Araujo, Carlos Roberto Elias e Rui Larosa, funcionários do Instituto Adolfo Lutz, pela colaboração nas atividades de coleta de flebotomíneos.

RIALA6/672

TANIGUCHI, H.H.; TOLEZANO, J.E. & D'ANDRADE, O.M. - The finding of *Lutzomyia (Pintomyia) damascenoi*, Mangabeira, 1941 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in São Paulo State, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):151-153, 1989.

ABSTRACT: From studies about sandflies fauna composition in endemic areas for the American Cutaneous Leishmaniasis in São Paulo State, the authors describe the finding of one male of *Lutzomyia (Pintomyia) damascenoi*, Mangabeira, 1941 collected in Morro do Diabo Forest Reserve which is located in Teodoro Sampaio County. This is the first record of this sandfly specie out of Amazonic area.

DESCRIPTORS: *Lutzomyia (Pintomyia) damascenoi*, geographic distribution, sandfly, American Cutaneous Leishmaniasis.

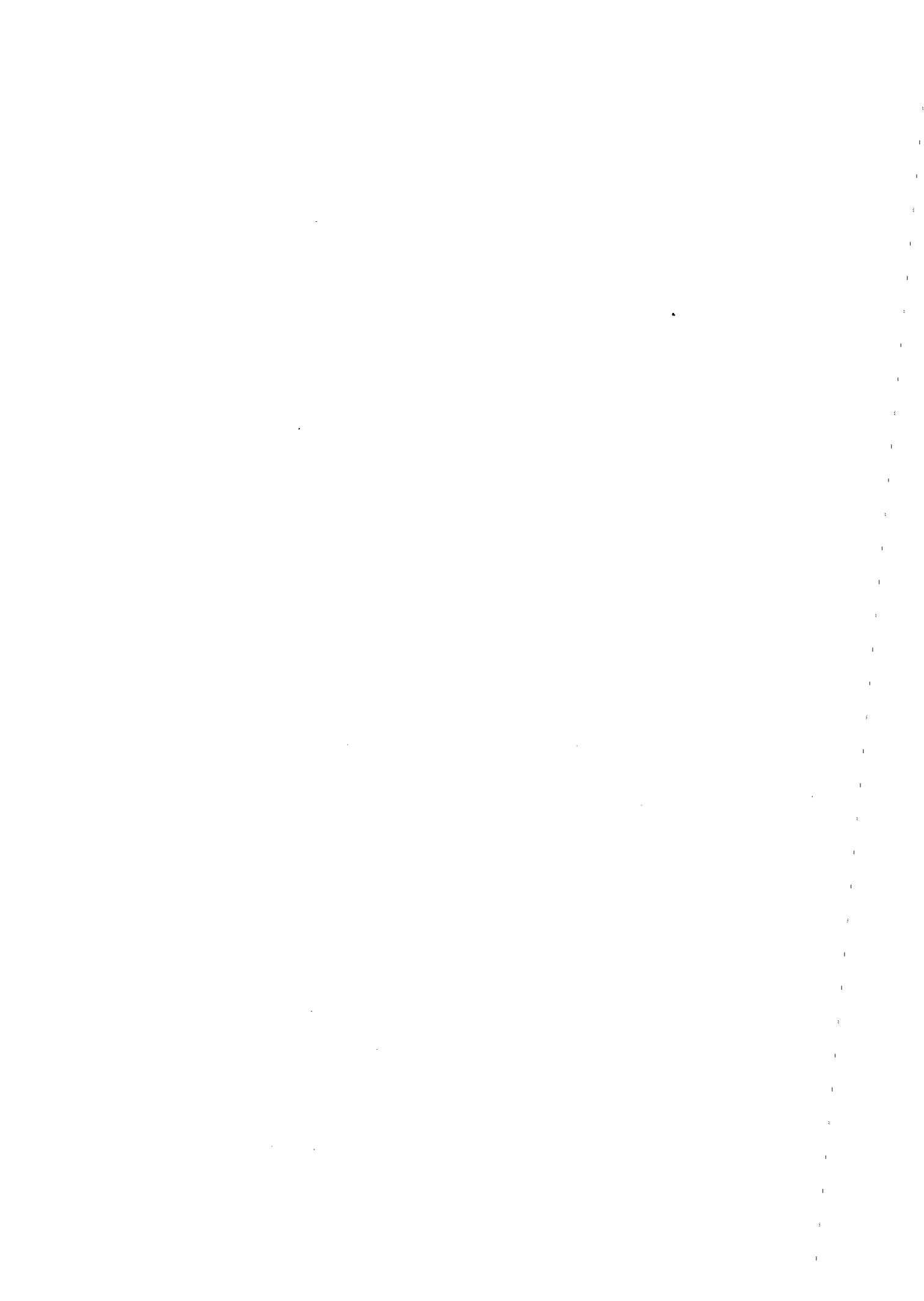
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FORATTINI, O.P. — *Entomologia médica*. São Paulo, Edgar Blucher/EDUSP, 1973. 658 p.
2. MANGABEIRA F^o, O. — 6ª Contribuição ao estudo dos *Flebotomus* — *Flebotomus (Pintomyia) damascenoi* n. sp. (Diptera Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 36: 369-77, 1941.
3. MARTINS, A.V.; MORALES-FARIAS, E.N. — Sobre

a distribuição geográfica dos flebotomíneos americanos (Diptera: Psychodidae; Phlebotominae). *Rev. bras. Biol.*, 32: 361-71, 1972.

4. MARTINS, A.V.; WILLIAMS, P. & FALCÃO, A.L. — American Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 1978. 195 p.

Recebido para publicação em 3 de abril de 1989.



DETERMINAÇÃO DE DEOXINIVALENOL EM TRIGO E MILHO EM GRÃO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA*

Myrna SABINO**
Alice Haruko ICHIKAWA**
Emiko Ikejiri INOMATA**
Leda C. A. LAMARDO**

RIALA6/673

SABINO, M.; ICHIKAWA, A.H.; INOMATA, E.I. & LAMARDO, L. C. A —
Determinação de deoxinivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em
camada delgada. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):155-159, 1989.

RESUMO: Em amostras de milho em grão e trigo de várias procedências, foi
verificada a ocorrência de deoxinivalenol (DON), utilizando a técnica de cromatografia
em camada delgada. Das 120 amostras analisadas, apenas duas apresentaram
deoxinivalenol com concentração de 183,0 µg/kg. O limite de determinação do
método foi de 110,0 µg on meg. Os testes de recuperação variaram de 80 a 100% para
o trigo e de 75 a 100% para o milho com médias de 90 a 85%, respectivamente. O
coeficiente de variação foi de 11%, tanto para o trigo como para o milho.

DESCRITORES: deoxinivalenol; análise milho; trigo; cromatografia em camada
delgada.

INTRODUÇÃO

Deoxinivalenol (DON) é uma micotoxina produzida principalmente pelos fungos *Fusarium graminearum*. Infestação de grãos de milho e cereais por *F. graminearum* e concomitante produção de DON ocorrem mais freqüentemente durante aqueles anos quando a maturação e época de colheita é chuvosa e fria². Os efeitos deletérios de DON em suínos e animais de laboratório foram descritos por vários autores^{7,24,27} e incluem recusa de alimentos, diminuição da eficiência dos alimentos, redução do ganho de peso, emesis, depleção do glicogênio hepático e hipoglicemia.

Estudos atuais do metabolismo têm sido conduzidos para determinar o destino desta toxina nos animais. YOSHIZAWA et alii³⁰ foram os primeiros a caracterizar um metabólito de DON, denominado DOM-1, em fezes e urina de rato.

DON, também conhecido como vomitoxina, foi pela primeira vez caracterizado no Japão²⁹ como um

metabólito de *Fusarium roseum* (*Fusarium graminearum*) isolado de cevada, que mostrou ser idêntico ao fator emético (vomitoxina) isolado de milho nos Estados Unidos de uma espiga deteriorada, produzindo vômitos em suínos²⁶. É um dos tricotecenos que ocorrem naturalmente e tem sido detectado em amostras de milho, cevada e trigo^{21,23,36}.

Os tricotecenos quando presentes em grãos utilizados nas rações de animais de criação causam doenças conhecidas como fusariotoxicoses^{5,8}. Informações sobre efeitos tóxicos em animais e humanos, expostos ao DON, são limitadas⁹.

Vários métodos têm sido propostos para a identificação e quantificação de DON: cromatografia em camada delgada^{3,25}, cromatografia a gás, cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massa^{16,22}, cromatografia líquida de alta resolução, utilizando o método de Romer modificado¹ e Elisa²⁸. Para a detecção de DON e outros tricotecenos, reagentes cromogênicos têm sido usados. Três destes reagentes, nicotinamida e 2 —

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

acetilpiridina⁶, 4 — (p-nitrobenzil) piridina¹⁰, e ácido cromotrópico¹², são específicos para tricotecenos. Porém, as análises relatadas têm sido aplicadas em padrões e não nas micotoxinas extraídas de grãos de cereais e rações.

No Brasil, a ocorrência de aflatoxinas em amendoim é alta^{4,11,13,14,15,16}, mas existem trabalhos^{17,19}, que demonstram que a incidência em milho é baixa. Com relação à incidência de tricotecenos pouco ou nada se conhece.

O objetivo deste trabalho é determinar deoxinivalenol pela técnica de cromatografia em camada delgada, cujos limites de detecção e reprodutibilidade são satisfatórios. Isto fornecerá dados sobre a incidência de DON, dando subsídios para a preservação da integridade dos grãos de cereais (principalmente milho e trigo) utilizados na produção de alimentos para o consumo humano e animal.

MATERIAL E MÉTODO

Foram analisadas 120 amostras de várias procedências, algumas adquiridas no comércio da cidade de São Paulo e outras enviadas para análise no Instituto Adolfo Lutz devido à suspeita de intoxicação em animais de criação. Estas eram constituídas de 50 amostras de milho em grão e 70 de trigo e derivados (farinha, farelo etc.).

O método empregado para análise foi o descrito por TRUCKSESS et alii²⁵, cuja representação esquemática está na figura 1.

A identificação, quantificação e recuperação do deoxinivalenol (DON) foram feitas pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de silicagel G 60 impregnadas com $AlCl_3$ 15%. Os resíduos finais das amostras foram dissolvidos em 200 μ l de clorofórmio-acetonitrila (4 + 1). Alíquotas de amostras (20 μ l para o trigo e 10 μ l para o milho) foram aplicadas nas placas, bem como alíquotas do padrão de concentrações conhecidas, e o cromatograma foi desenvolvido utilizando como fase móvel clorofórmio-acetona-isopropanol (8 + 1 + 1). Como alternativa, acetato de etila — éter etílico (1 + 1) — pode também ser empregado. Nos testes de recuperação, a segunda opção demonstrou melhor resolução.

Após o desenvolvimento do cromatograma, as placas foram aquecidas durante 7 minutos, sendo a visualização feita sob luz ultravioleta (366 nm) e, após comparação das intensidades das manchas fluorescentes (azul a um $R_f = 0,6$), foi calculado o teor de deoxinivalenol presente na amostra analisada.

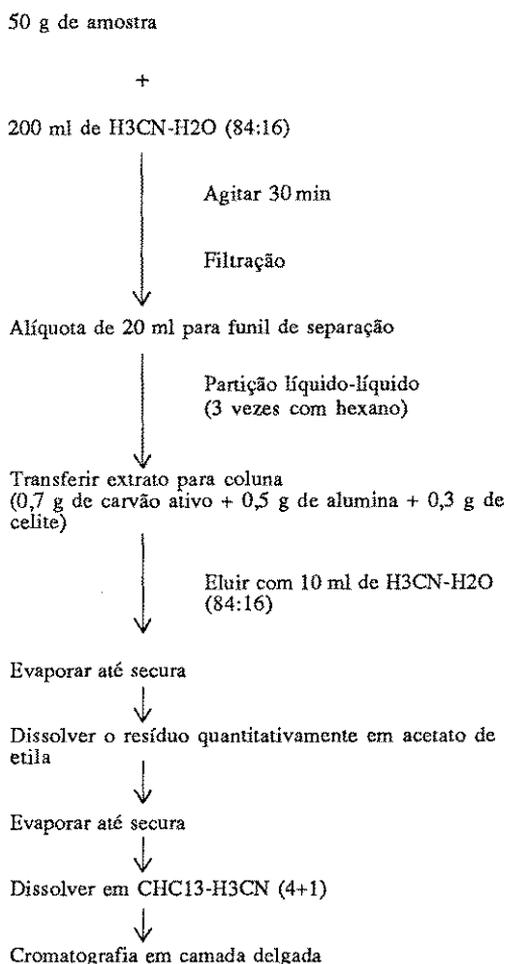


FIGURA 1 — Esquema de separação de deoxinivalenol

A determinação da concentração do padrão foi feita por espectrofotometria de absorção na região UV de acordo com AOAC²⁰, sendo que o padrão foi dissolvido sob agitação vigorosa em acetato de etila. A absorbância (A) foi medida em 260 nm; o peso molecular e absorvidade molar (E) de DON são 296 e 1.410, respectivamente. Para auxiliar a confirmação, foi realizada também a co-cromatografia, superpondo alíquotas de padrão nas alíquotas dos extratos das amostras no desenvolvimento do cromatograma.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises estão apresentados nas tabelas 1 e 2. Verificando a tabela 1, observa-se que não foi detectado deoxinivalenol em nenhuma das 50 amostras de milho analisadas.

TABELA 1

Níveis de DON em amostras de milho em grão determinadas por cromatografia em camada delgada

Procedências das amostras	Nº amostras analisadas	DON $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb)
Estados Unidos	16	ND
São Paulo	14	ND
Santa Catarina	11	ND
Minas Gerais	4	ND
Rio Grande do Sul	5	ND
Total	50	

ND — não detectado: não aparecimento de fluorescência no cromatograma.

TABELA 2

Níveis de DON em amostras de trigo determinados por cromatografia em camada delgada

Tipo de amostra	Nº amostras analisadas	DON $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb)
Farinha de trigo comum	10	ND
Farinha de trigo especial	5	ND
Farinha de trigo integral	1	ND
Farelo de trigo	18	ND
Fibra de trigo	13	ND
Germe de trigo cru	9	ND
Germe de trigo torrado	9	ND
Trigo moído	2	ND
Farelo de trigo (como ração)	2	183
Trigo in natura	1	ND
Total	70	

ND — não detectado: não aparecimento de fluorescência no cromatograma.

Observando-se a tabela 2, em que é mostrada a incidência de deoxinivalenol em 70 amostras de trigo, verificou-se que foi baixa, tendo sido detectada em apenas 2 amostras no teor de 183 $\mu\text{g}/\text{kg}$, amostras estas de farelo de trigo que estavam sendo utilizadas como ingrediente em ração e suspeitas de intoxicar os animais.

Os teores de deoxinivalenol foram expressos em $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) e o não aparecimento de fluorescência no cromatograma foi representado pela abreviatura ND (não detectado).

Os resultados de recuperação de deoxinivalenol adicionados em amostras de trigo e milho isentas de toxinas estão reportados na tabela 3.

Melhores resultados obtidos na recuperação foram no nível de 110 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sendo, portanto, nosso limite de determinação para os dois produtos (trigo e milho). Concentrações abaixo desta não foram de boa resolução tanto nas amostras de milho como nas amostras de trigo. TRUCKSESS *et alii*²⁵ obtiveram maior sensibilidade. O limite de determinação encontrado por estes autores foi de 40 ng/g para o trigo e 100 ng/g para o milho.

A concentração mínima por nós detectada foi de 22 ng/mancha, enquanto a concentração mínima detectável por TRUCKSESS *et alii*²⁵ foi de 20 ng/mancha. É importante salientar que a intensidade de fluorescência das manchas de DON depende da concentração de AlCl_3 impregnado na placa de sílica gel (15%) e também do tempo de aquecimento.

A não detecção do DON nas amostras de milho analisadas e a incidência em 3% das amostras de trigo não significa que o problema não existe. Outros estudos devem ser efetuados com um número maior de amostras.

Estudos realizados no Canadá têm mostrado que, em geral, os níveis de DON decrescem cerca de 40%

TABELA 3

Recuperação de DON adicionada em farinha de trigo e milho

Tipo de amostra	DON adicionada (ng/g)	Recuperação (média) %	dp	cv %
Trigo	110	90 (100, 80, 100, 80, 90)	10,0	11
Milho	110	85 (75, 86, 100, 80, 86)	9,3	11

dp = desvio padrão

cv = coeficiente de variação

durante o processamento industrial do trigo bruto para a obtenção da farinha, exceto no processo de fermentação para a produção de "donuts" que indica um aumento no teor de DON²¹.

TANAKA *et alii*²¹ verificaram a ocorrência da vários tricotecenos, entre eles do DON, em amostras de cereais, alimentos e rações procedentes de 19 países. Trigo, cevada, aveia, centeio, arroz, e seus produtos, totalizando 500 amostras, foram positivas para nivalenol, DON e zearalenona em 244, 223, 219 amostras, respectivamente. Cerca de 40 a 50% das amostras analisadas foram positivas para DON com uma concentração média de 292 ng/g.

A habilidade do fungo produzir a toxina é grandemente influenciada por fatores ambientais como temperatura e umidade. Portanto, análises seqüenciais de cereais são necessárias para dar maior valor na informação sobre o nível de freqüência da ocorrência da toxina fúngica.

TANAKA *et alii*²¹, de acordo com os dados acumulados, sugerem que a contaminação de ce-

reais, por exemplo, por nivalenol, não é problema local no Japão e outros países da Ásia. E detectado em várias amostras de cereais e alimentos procedentes de diferentes países e distritos. Em adição é importante salientar que há algumas diferenças entre países quanto ao nível e freqüência de nivalenol e DON em cereais. No Japão e Coreia, os níveis de nivalenol em trigo e cevada são muito mais altos do que o DON, enquanto na Argentina, Canadá, China, Polônia e Alemanha Ocidental, DON é o maior contaminante. Além disso, em um mesmo país há diferenças regionais.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos indicam que a incidência de DON não reflete uma preocupação mais séria como ocorre com aflatoxina em amendoim. Entretanto, estes dados poderiam ser atribuídos às condições ambientais (umidade e temperatura), necessitando de um estudo por um período mais longo e maior número de amostras de regiões distintas, a fim de se ter uma visão do nível e a freqüência da presença do DON em nosso meio.

RIALA6/673

SABINO, M.; ICHIKAWA, A.H.; INOMATA, E.I. & LAMARDO, L.C.A. — Survey of deoxynivalenol in wheat and corn grain using thin-layer chromatography method. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):155-159, 1989.

ABSTRACT: the occurrence of deoxynivalenol was shown by thin-layer chromatography in samples of corn grain and wheat from various places of the city of São Paulo. Of 120 samples analysed, two had deoxynivalenol at levels of 183 µg/kg. The limit of DON determination is about 110 µg/kg. Recoveries of DON added to wheat and corn ranged from 80 to 100% and 75 to 100%, respectively. The coefficient of variation obtained with artificially contaminated samples was 11% for both wheat and corn.

DESCRIPTORS: deoxynivalenol; analysis corn; wheat; thin layer chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHANG, H.L.; DEVRIES, J.W.; LARSON, P.A. & PATEL, H.H. — Rapid determination of deoxynivalenol (vomitoxin) by liquid chromatography using modified Romer column cleanup. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 67:52-4, 1984.
2. CÔTÉ, L.M.; NICOLLETTI, J.; SWANSON, S.P. & BUCK, W.B. — Production of deepoxy deoxynivalenol (DOM-1), a metabolite of deoxynivalenol, by *in vitro* rumen incubation. *J. agric. food Chem.*, 34:458-60, 1986.
3. EPPLEY, R.M.; TRUCKSESS, M.W.; NESHEIM, S.; THORPE, C.W.; WOOD, G.E. & POHLAND, A.E. — Deoxynivalenol winter wheat: thin layer chromatographic method and survey. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 67:43-5, 1984.
4. FONSECA, H. — Contribuição e estudo de aflatoxina no amendoim (*Arachis hypogaea* L.) da colheita à industrialização. Piracicaba 1969. 98p. [Tese livre docência — Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queirós" — Universidade de São Paulo].
5. FORSYTH, D.M.; YOSHIZAWA, T.; MOROOKA, N. & TUIE, J. — Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. *Appl. environ. Microbiol.*, 34:547-52, 1977.
6. JOSEFSSON, E. & MOLLER, T.E. — Screening method for the detection of aflatoxins, ochratoxin, patulin, sterigmatocystin, and zearalenone in cereals. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 60:1369-71, 1977.
7. KHERA, K.S.; ARNOLD, D.L.; WHALEN, C.; ANGERS, G. & SCOTT, P.M. — Vomitoxin (4-

- Deoxynivalenol): Effects on reproduction of mice and rats. *Toxicolog. appl. Pharmacol.*, 74:345-56, 1984.
8. MIROCHA, C.J.; PATHRE, S.V.; SCHAUERHAMER, B. & CHRISTENSEN, C.M. — Natural occurrence of Fusarium toxins in feedstuff. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32:553-6, 1976.
 9. PATHRE, S.V. & MIROCHA, C.J. — Trichothecenes: natural occurrence and potential hazard. *J. am. Oil Chem. Soc.*, 56:820-823, 1979.
 10. PATTERSON, D.S.P. & ROBERTS, B.A. — Mycotoxins in animal feedstuffs: sensitive thin layer chromatographic detection of aflatoxin, ochratoxin A, sterigmatocystin, zearalenone, and T-2 toxin. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 62: 1265-67, 1979.
 11. PRADO, G. - Incidência de aflatoxina B1 em alimentos. *Rev. Farm. Bioquim.*, 5: 147-57, 1983.
 12. ROBERTS, B.A.; GLANCY, E.M. & PATTERSON, D.S.P. — Rapid, economical method for determination of aflatoxin and ochratoxin in animal feedstuffs. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 64:961 - 3, 1981.
 13. SABINO, M. — Variações de níveis de aflatoxina B1 em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40:153-8, 1980.
 14. SABINO, M. & CORRÊA, M.J.S. — Aflatoxina B1 em feijão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41:837-7, 1981.
 15. SABINO, M.; INOMATA, E.I. & LAMARDO, L.C.A. — Variação dos níveis de aflatoxina B1 em pasta de amendoim e paçoca consumidas no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42:39-44, 1982.
 16. SCOTT, P.M. — Assessment of quantitative methods for determination of trichothecenes in grains and grain products. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 65:876-83, 1982.
 17. SCUSSEL, V.M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. — Teores de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados em Campinas em 1980/82. *Bol. Soc. bras. Ciênc. Tecnol. Alimen.*, Campinas, 19:109-19, 1985.
 18. SCUSSEL V.M.; RODRIGUEZ -AMAYA, D.B. & SILVA, W.J. — Incidência de aflatoxina em milho (*Zea mays L.*) e em seus produtos derivados, comercializados na região de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 6:75-85, 1986.
 19. SOARES, L.M.V. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. — Survey of aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in Some Brazilian Foods by Using Multi - toxin Thin-Layer Chromatographic Method. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 72:22-6, 1989.
 20. STOLOFF, L. & SCOTT, P.M. — Natural poisons. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical chemists 14 th ed.* Arlington, Virginia, A.O.A.C., 1984. p. 479 [item 26009].
 21. TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; YAMAMOTO, S.; LEE, U.S.; SUGIURA, Y. & UENO Y. — Worldwide contamination of cereals by the Fusarium mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. *J. agric. Food Chem.*, 36:979-83, 1988.
 22. TERHUNE, S.J.; NGUYEN, N.V.; BAXTER, J.A.; PRYDE, D.H. & QURESHI, S.A. — Improved gas chromatographic method for quantitation of deoxynivalenol in wheat, corn and feed. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 67:1102-04, 1984.
 23. TRENHOLM, H.L.; COCHRANE, W.P.; COHEN, H.; ELLIOT, J.L.; FARNWORTH, E.R.; FRIEND, D.W.; HAMILTON, R.M.G.; STANDISH, J.F. & THOMPSON, B.K. — Survey of vomitoxin contamination of 1980 Ontario white winter wheat crop: results of survey and feeding trials. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 66:92-7, 1983.
 24. TRENHOLM, H.L.; THOMPSON, B.K.; HARTIN, K.E.; GREENHALGH, R. & McALLISTER, A.J. — Ingestion of vomitoxin (deoxynivalenol) contaminated wheat by nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 68:1000-5, 1985.
 25. TRUCKSESS, M.W.; NESHEIM, S. & EPPLEY, R.M. — Thin-layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 67:40-3, 1984.
 26. VESONDER, R.F.; CIEGLER, A. & JENSEN, A.H. — Isolation of the emetic principle from Fusarium infected corn. *Appl. Microbiol.*, 26:1008-10, 1973.
 27. VESONDER, R.F.; CIEGLER, A.; JENSEN, A.H.; ROHWEDDER, W.K. & WEISLEDER, D. et alii — Co-identity of the refusal and emetic principle from Fusarium infected corn. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31:280-5, 1976.
 28. XU, YI-CHUN; ZHANG, G.S. & CHU, FUN S. — Enzyme-Linked Immunosorbent assay for deoxynivalenol in corn and wheat. *J. Assoc. off. anal. chem.*, 71(5):945-9, 1988.
 29. YOSHIZAWA, T. & MOROOKA, N. — Deoxynivalenol and its monoacetate: new mycotoxins from Fusarium roseum and moldy barley. *Agric. biol. Chem.*, 37:2933-34, 1973.
 30. YOSHIZAWA, T.; TAKEDA, H. & OHI, T. — Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals. *Agric. Biol. Chem.*, 47: 2133-5, 1983.
 31. YOUNG, J.C.; FULCHER, R.G.; HAYHOE, J.H.; SCOTT, P.M. & DEXTER, J.E. — Effect of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of eastern canadian wheats. *J. agric. Food Chem.*, 32(3): 659-64, 1984.

Recebido para publicação em 10 de abril de 1989.

OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS EM CRIANÇAS COM DIARRÉIA NO MUNICÍPIO DE JUIZ DE FORA, MINAS GERAIS, BRASIL

Murilo Gomes OLIVEIRA*
Gil Vital Álvares PESSÔA**
Leda Kano NAKAHARA***

RIALA6/674

OLIVEIRA, M.G.; PESSÔA, G.V. & NAKAHARA, L.K. — Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em crianças com diarréia no Município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):161-167, 1989.

RESUMO: A ocorrência de bactérias enteropatogênicas e sua resistência a antimicrobianos são analisadas no Município de Juiz de Fora, MG, Brasil. Em 187 espécies fecais provenientes de crianças diarréicas, na faixa etária de 0 a 5 anos, foram isolados 64 enteropatógenos, destacando-se o gênero *Shigella* — 31 amostras — das quais 29 pertenceram ao subgrupo B, sendo 25 do sorotipo B2, EPEC, ETEC e *Salmonella* foram recuperados em 8,0%, 6,9% e 2,6% dos casos, respectivamente. Não foi isolada nenhuma amostra de EIEC. Observou-se elevada resistência aos antimicrobianos, notadamente entre as *shigella*. São discutidos aspectos referentes ao saneamento básico das áreas estudadas.

DESCRIPTORIOS: diarréia; *E.coli* enteropatogênicas clássicas; *E.coli* enterotoxigênica; *E.coli* enteroinvasiva; *Shigella*; Município de Juiz de Fora, MG., *Shigella*, Município de Juiz de Fora.

INTRODUÇÃO

Diarréia tem sido reconhecida como causa principal de morbidade e mortalidade infantil nos países em desenvolvimento^{15,19,35}. Sua alta incidência e prevalência nesses países constitui um reflexo das condições de higiene, saneamento básico e assistência médica, aliados à desnutrição como causa básica ou associada^{10,15,19}. O incremento da pesquisa microbiológica nos últimos vinte anos permitiu a melhoria no diagnóstico etiológico das infecções intestinais, através da descrição de novos agentes bacterianos e virais. O reconhecimento desses agentes serve como suporte para a adoção de medidas terapêuticas e profiláticas para seu controle¹⁷.

Juiz de Fora, a segunda maior cidade do Estado de Minas Gerais, Brasil, mostrou, em 1984, um índice de mortalidade de 44,6/mil²⁰. Alertados por este dado e pela inexistência de informações relativas à

etiologia e epidemiologia das diarréias infantis na cidade, procuramos determinar, pela primeira vez, a ocorrência de enteropatógenos bacterianos clássicos — *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC), *Salmonella* e *Shigella* — em crianças diarréicas, avaliar a resistência a antimicrobianos e relacioná-los às condições de saneamento básico das áreas estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

De outubro de 1984 a maio de 1985 foram examinadas as fezes de 187 crianças, na faixa etária de 0 a 5 anos, das quais 148 foram atendidas em ambulatórios e 39 estavam internadas em enfermaria de Pediatria.

Utilizaram-se para a coprocultura fezes recém-emitidas espontaneamente ou através de estímulo

* Do Departamento de Microbiologia, U.F. Juiz de Fora, Juiz de Fora MG.

** Do Departamento de Microbiologia, I.C.B. USP, São Paulo, SP.

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

do esfíncter anal com zaragatoa estéril sendo, então, transportadas em solução salina glicerina-da tamponada²⁸ na proporção de aproximadamente 1/9 de fezes para 10 ml da solução. As amostras foram mantidas em geladeira (4°C) até serem processadas.

A metodologia para isolamento e diagnóstico presuntivo baseou-se na empregada por PESSÔA *et alii*²⁴. Foi feita a caracterização bioquímica conforme EDWARDS & EWING⁶ e, a seguir, determinaram-se os sorogrupos e sorotipos para as amostras de *Escherichia coli*. (EPEC, ETEC e EIEC), *Salmonella* e *Shigella*. ETEC foi identificada através da pesquisa da enterotoxina termoestável (Sta) pelo método de DEAN *et alii*⁵. Nas amostras Sta positivas pesquisaram-se os fatores de colonização (Cfa) segundo EVANS *et alii*⁷, seguida de so-roaglutinação específica. As cepas bioquimicamente suspeitas de colibacilos invasores foram analisadas sorologicamente e submetidas ao teste de invasibilidade de SERÉNY²⁹.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado de acordo com o preconizado por BAUER *et alii*². As drogas escolhidas e as respectivas concentrações nos discos de procedência Cefar Diagnóstica Ltda. foram as seguintes: ácido nalidíxico (AN)-30 mcg, amicacina (AM) - 30 mcg, ampicilina (Ap) - 10 mcg, canamicina (Kn) - 30 mcg, Cefalotina (Cf) - 30 mcg, Cefoxitina (Ct) - 30 mcg, cloranfenicol (Cl) - 30 mcg, fosfomicina (Fo) - 50 mcg, gentamicina (Gn) - 10 mcg, sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) - 25 mcg e tetraciclina (Te) - 30 mcg.

RESULTADOS

Das 187 amostras de fezes estudadas, 63 (38,7%) foram positivas para, pelo menos, um dos enteropatógenos pesquisados.

Dentre as enterobactérias isoladas, a mais freqüente foi a *Shigella*, encontrada em 16,5% dos casos. Destaca-se o predomínio do subgrupo B (93,5%) sorotipo 2 (86,2%) entre as shiguelas, equivalendo a 39,6% dos isolamentos. A seguir, obteve-se EPEC, isolada 15 vezes (8,0%), distribuída em 5 grupos sorológicos, com predomínio do sorogrupos 0119. ETEC incidiu 13 vezes (6,9%), *Salmonella* 5 (2,6%) e EIEC não foi encontrada. Em apenas um dos casos encontrou-se uma associação entre os enteropatógenos, representada pelo isolamento de *Shigella flexneri* : 4 e *Escherichia coli* enterotoxigênica 0159 (tabela 1). Houve uma concentração de isolamentos (70%) no grupo etário de 0 a 2 anos. Para EPEC o predomínio nas crianças de 0 a 11 meses foi marcante, enquanto para *Shigella* a distribuição foi homogênea (tabela 2).

TABELA 1

Distribuição dos enteropatógenos isolados a partir de 187 fezes diarreicas

Enteropatógenos	Nº Amostras	%
E.P.E.C.		
0119	8	4,2
055	2	1,0
0127	2	1,0
026	2	1,0
086	1	0,5
Subtotal	15	8,0
E.T.E.C.		
Sta + (a)	13	6,9
<i>Salmonella</i>		
<i>S. enteritidis</i>	2	1,0
<i>S. typhimurium</i>	1	0,5
<i>S. infantis</i>	1	0,5
<i>S. I 4,5,12:ii-</i>	1	0,5
Sub-Total	5	2,6
<i>Shigella</i>		
<i>Sh. flexneri 1</i>	1	0,5
<i>Sh. flexneri 2</i>	25	13,4
<i>Sh. flexneri 3</i>	2	1,0
<i>Sh. flexneri 4 (a)</i>	1	0,5
<i>Sh. sonnei</i>	2	1,0
Sub-total	31	16,5
E.I.E.C	-	-
Total	64	33,7 (a)

(a) 1 caso em associação *Shigella flexneri 4* e ETEC 0159

Não houve diferença significativa ao nível de 5% para o isolamento dos enteropatógenos pesquisados entre os pacientes hospitalizados e ambulatoriais (tabela 5).

Os testes de sensibilidade se caracterizaram pelo alto padrão de resistência (tabela 3), observado notadamente nas amostras de *Shigella* e ETEC. Os maiores percentuais de resistência foram verificados para Ap, Kn, SXT e Te. A tabela 4 expressa os modelos de resistência das shiguelas. Verifica-se uma multirresistência, presente em 80% das amostras.

DISCUSSÃO

A positividade de coproculturas em determinados grupos populacionais varia de acordo com a condição sócio-econômico-cultural destes grupos e com a vigência ou não de surtos epidêmicos^{15,19}.

O presente estudo demonstrou uma positividade de 33,7% (tabela 1), o que é compatível

TABELA 2

Distribuição dos 64 enteropatógenos isolados em relação à faixa etária

Enteropatógeno (N ^o)	Idade		Meses				Anos							
			0 - 5m		6 - 11m		1 - 2a		2 - 3a		3 - 4a		4 - 5a	
	N ^o	%	N ^o	%										
Shigella (31)	5	16,10	5	16,10	9	29,00	5	16,10	2	6,40	5	16,10		
E.P.E.C. (15)	10	66,60	3	20,00	2	13,33	-	-	-	-	-	-	-	-
E.T.E.C. (13)	4	30,80	4	30,80	1	7,70	2	15,40	2	15,40	-	-	-	-
Salmonella (5)	-	-	2	40,00	-	-	-	-	1	20,00	2	40,00	-	-
Total (64)	19	29,60	14	21,80	12	18,70	7	10,90	5	7,80	7	10,90		

NOTA: % em relação ao número de amostras de cada enteropatógeno.

TABELA 3

Distribuição percentual da resistência a antimicrobianos expressa pelos enteropatógenos isolados

Antimicrobianos (a)	Enteropatógenos				
	Shigella	Salmonella	E.P.E.C.	E.T.E.C.	Total
An	9,6	0,00	0,00	0,00	4,7
Am	19,3	20,00	0,00	38,40	18,7
Ap	25,8	40,00	66,60	53,80	43,7
Cf	29,0	80,00	33,30	92,30	48,4
Ct	16,1	20,00	13,30	23,00	17,2
Ci	77,4	20,00	13,30	0,00	42,2
Fo	3,2	0,00	6,60	0,00	3,1
Gn	6,4	40,00	20,00	3,40	18,7
Kn	29,0	60,00	46,60	76,90	45,3
SXT	93,5	20,00	53,30	53,80	71,9
Te	77,4	80,00	20,00	53,80	59,4

(a) Abreviações em material e métodos.

TABELA 4

Modelos de resistência dos sorotipos de Shigella isolados

Modelos de resistência dos sorotipos de Shigella	B1	B2	B3	B4	D	Total (a)
Sensível					1	1
SXT	1					1
Ap SXT		1			1	2
C1 SXT		1	1			2
C1 SXT Te		10				10
An C1 Kn SXT		1				1
Ap C1 SXT Te		3				3
Ap Kn SXT Te				1		1
Cf C1 SXT Te		1				1
Am Cf C1 Kn Te		1				1
Am Cf Kn SXT Te			1			1
Am C1 Kn SXT Te		1				1
Ap Cf Ct C1 SXT Te		1				1
An Ap Cf Ct SXT Te		1				1
Cf Ct C1 Kn SXT Te		1				1
Am Cf C1 Gn Kn SXT Te		1				1
Am Cf Ct C1 Gn Kn SXT Te		1				1
An Am Cf Ct C1 Fo Kn SXT Te		1				1
Total	1	25	2	1	2	31

(a) Freqüência de ocorrência do modelo de resistência.

com os achados de pesquisadores em várias regiões do Brasil, para os mesmos enteropatógenos: São Paulo, 29,5%²³ e 31,8%¹²; Fortaleza, 30,5%¹⁰; Manaus, 36,3%⁸ e Rio de Janeiro, 36,3%¹⁶.

Observando a ocorrência individual dos enteropatógenos, destaca-se a presença de bactérias do gênero *Shigella* em 16,5% dos casos, o que corresponde a 49,2% dos isolamentos. Índices semelhantes só foram detectados nas décadas de 40 e 50 no Rio de Janeiro e São Paulo, locais que mostraram, posteriormente, uma diminuição desses percentuais, ligados, provavelmente, à melhoria nas condições de saneamento básico aí ocorridas (quadro 1).

A Organização Mundial de Saúde estabelece como meta para redução da morbi-mortalidade por diarréia uma cobertura de 80% e 55% de água e esgotos, respectivamente, nas áreas urbanas²².

Por outro lado, a prevalência de shigelose numa população serve como indicador de suas condições de higiene e saneamento básico³⁴. Juiz de Fora apresentou, em 1987¹³, índices de 92% e

QUADRO 1

Incidência de Shigella no Brasil segundo diversos autores

Ano	Local	Shigella %	Autores
1945	Rio de Janeiro	24,5	ARAGÃO e RIBEIRO (citado em COSTA <i>et alii</i> , 1957)
1945	São Paulo	16,5	TAUNAY <i>et alii</i> , 1945
1947	Rio de Janeiro	17,8	ASSIS e RIBEIRO (citado em COSTA <i>et alii</i> , 1957)
1950	Porto Alegre	6,9	BUDIANSKY (citado em COSTA <i>et alii</i> , 1957)
1951	São Paulo	9,1	TAUNAY, 1951
1954	Rio de Janeiro	4,6	COSTA <i>et alii</i> , 1957
1970	Botucatu	10,4	MONTELLI e TRABULSI, 1970
1971	São Paulo	2,5	TAUNAY <i>et alii</i> , 1971
1972	Ribeirão Preto	4,0	CUNHA <i>et alii</i> , 1972
1975	Florianópolis	0,0	GUERRANT <i>et alii</i> , 1975
1978	São Paulo	2,8	PESSÔA <i>et alii</i> , 1978a
1981	Santos	11,2	PESSÔA <i>et alii</i> , 1981
1981	Recife	12,0	MAGALHÃES <i>et alii</i> , 1981
1982	Fortaleza	4,6	RIEDEL <i>et alii</i> , 1982
1983	Pacatuba	8,0	GUERRANT <i>et alii</i> , 1983
1984	São Paulo	3,8	IRINO <i>et alii</i> , 1984
1985	Manaus	12,0	GIUGLIANO & GIUGLIANO, 1985
1985	Juiz de Fora	16,5	presente trabalho
1988	Rio de Janeiro	5,1	LACERDA <i>et alii</i> , 1988

88% para água e esgotos, estabelecendo-se, assim, uma conflitância com as elevadas taxas de *Shigella* por nós detectadas. Os maiores percentuais de isolamento de shigelas ocorreram em áreas periféricas, com baixo poder de renda, caracterizando uma disparidade na distribuição daqueles serviços em função das diferentes classes econômicas. Não se pode descartar o envolvimento do sistema de tratamento e distribuição de água, obsoleto e vulnerável à contaminação por microrganismos de origem fecal. O mesmo raciocínio se aplica ao sistema de esgoto, cuja drenagem é a céu aberto e não existe tratamento adequado.

Chama a atenção o achado de 61,2% das shigelas em crianças abaixo de 2 anos (tabela 2), fato preocupante pelas características de transmissão da infecção. Relevante também é a predominância da *Shigella flexneri* (93,5%) em relação à *Shigella sonnei* e o percentual elevado do sorotipo B2 (86,2%) em relação aos outros sorotipos (tabela 1). Estes dados são bem superiores à média nacional de 65% para o subgrupo

B e 35% para o sorotipo B2^{12,23,27}.

Na análise dos diversos modelos de resistência apresentados pelas shigelas (tabela 4), o sorotipo B2 aparece com marcas fixas como Cl-Te-SXT em 80% dos casos, sugerindo a predominância de um mesmo plasmídeo e uma possível origem comum dessas amostras. É de se ressaltar a elevada resistência das shigelas ao SXT (tabela 3), fato recente no Brasil^{16, 33}.

Em relação à EPEC, o índice de 80% é compatível com os referidos por alguns autores no Brasil^{8,10,12,21}, considerando-se a possibilidade de variações regionais e de casuística. É de se destacar o predomínio do sorogrupo 0119 e o não-isolamento do sorogrupo 0111, de distribuição universal. Isto reforça a necessidade epidemiológica de se classificar rotineiramente os sorogrupos de EPEC para sua melhor avaliação.

As investigações sobre ETEC no Brasil são limitadas em decorrência da complexidade dos

TABELA 5

Enteropatógenos isolados em 35 pacientes hospitalizados e 148 ambulatoriais

Enteropatógenos	Origem dos pacientes			
	Hospitalizados Nº	% (a)	Ambulatoriais Nº	% (b)
Shigella	8	20,5	23	15,5
E.P.E.C.	3	7,6	12	8,1
E.T.E.C.	1	2,5	12	8,1
Salmonella	1	2,5	4	2,7
Total	13	33,3	51	34,4

(a) % em relação ao número total de hospitalizados.

(b) % em relação ao número total de ambulatoriais.

testes necessários a sua identificação. *Escherichia coli* produtora de enterotoxina Sta foi encontrada em 6,9% das amostras estudadas. A pesquisa apenas de enterotoxina Sta foi fundamentada na evidência epidemiológica de sua participação na diarreia por ETEC, isoladamente ou associada à enterotoxina LT e ao freqüente achado de amostras com fenótipo LT+ em indivíduos não-diarreicos^{1,10, 18,19,26,36}. Detectaram-se fatores de colonização em 9 (69,1%) das amostras Sta+, todos do tipo CFA/I. 46,2% das amostras aglutinaram com os antissoros testados. Entre estas amostras observou-se que os sorogrupos 078 e 0128 possuíam CFA/I, confirmando as observações que mostram ser a produção de Sta e a presença de determinados fatores de colonização restritos a certos sorogrupos ou sorotipos^{9,17}. O achado do sorogrupo 025 — que pode estar ligado ao fator E8775 — e 0159 não possuidor de CFA/I e CFA/II, também confirma essas observações.

A alta resistência observada para ETEC Sta+, semelhante ao encontrado no Chile¹, aventa a possibilidade da existência de genes plasmidiais, com características regionais, codificando simultaneamente fatores de virulência.

Foi baixa a recuperação de bactérias do gênero *Salmonella*. É possível que esta freqüência se deva à predominância de casos ambulatoriais em nossa amostragem e aos hábitos alimentares da população.

Amostras de EIEC não foram isoladas, fato que coaduna com os baixos índices constantes na literatura e sua maior prevalência em adultos e crianças em idade escolar^{8,10,12,13,26}.

Quando analisamos a ocorrência dos enteropatógenos em relação à procedência dos pacientes, entendemos que, na ausência de surtos hospitalares, o índice de 20,5% *Shigella* entre os hospitalizados seja reflexo da gravidade do quadro clínico desta infecção, que conduz à necessidade de internação. O achado de 7,6% de EPEC nas crianças hospitalizadas é de interesse epidemiológico à medida que esta presença influencia na manutenção e disseminação de infecções hospitalares por este enteropatógeno.

O presente estudo alerta para a elevada ocorrência de shigelose em Juiz de Fora, envolvendo a *Shigella flexneri* sorotipo 2. A prevalência deste sorotipo e a homogeneidade em seu padrão de resistência aos antimicrobianos mostram a necessidade de estudos no sentido de caracterizar a origem dessas amostras. O controle de shigelose na cidade deverá envolver uma revisão nos sistemas de abastecimento de água e esgotos no que tange à qualidade e distribuição não diferenciada, seguida de educação sanitária adequada.

Agradecimentos

À Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz e Lucimar Gonçalves Milagres.

RIALA6/674

OLIVEIRA, M.G.; PESSÔA, G.V. & NAKAHARA, L.K. — Enteropathogenic bacteria occurrence in diarrheic children living in Juiz de Fora Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):161-167, 1989.

ABSTRACT: The enteropathogenic bacteria occurrence and their resistance to antimicrobial drugs are analysed in Juiz de Fora, MG, Brazil. Among 187 fecal samples proceeding from diarrheic children between 0-5 years of age 64 enteropathogens were isolated with predominance of *Shigella*. Of 31 *Shigella* isolated 29 belonged to the subgroup B where the predominant serotype was B2 with 25 isolated. EPEC, ETEC and *Salmonella* were recovered in 8,0%, 6, 9% and 2,6%, of the cases, respectively. No EIEC strain has been isolated. It was verified high resistance to antimicrobials drugs, especially among shigellae. Basic sanitation referring to the studied areas are discussed.

DESCRIPTORS: diarrhoea, enteropathogenic bacteria, *Shigella*, Juiz de Fora Municipality.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUERO, M.E.; REYES, L.; PRADO, V.; ORSKOV, L.; ORSKOV, F. & CABELLO, F.C. — Enterotoxigenic *Escherichia coli* in a population of infants with diarrhea in Chile. *J. clin. Microbiol.* 22(4): 576-81, 1985.
2. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 45: 498-6, 1966.
3. COSTA, G.A.; SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I.R. — Tipos de *Salmonella* e *Shigella* ocorrentes no Rio de Janeiro. *An. Microbiol.* 5: 305-18, 1957.
4. CUNHA, I.P.; KAKU, M.; ITO, I.Y. & BARACCHINI, O. — Sobre a freqüência de isolamento de enterobactérias patogênicas nas fezes de crianças de Ribeirão Preto, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 75-7, 1972.
5. 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 (4): 407-11, 1972.
6. EDWARDS, P.R. & EWING, W.N. — Identification of *Enterobacteriaceae*. Brd. ed. Minneapolis, Burgess Publ., 1972.
7. EVANS, D.G.; EVANS Jr., D.G. & WEILLIE, J.J. — Haemagglutination 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. GIUGLIANO, L.G. & GIUGLIANO, R. — Etiologia das diarreias agudas em Manaus: observações ambulatoriais e na comunidade. *Rev. Microbiol.*, 16 (3): 234-9, 1985.
9. GROSS, R.J. & ROWE, B. — *Escherichia coli* diarrhoea. *J. Hyg. Camb.*, 95: 531-50, 1985.
10. GUERRANT, R.L.; KIRCHOFF, L.V.; SHIELDS, D.S.; NATIONS, M.K.; LESLIE, J.; SOUZA, M.A.; ARAUJO, J.G.; CORREIA, L.L.; SAUER, K.T.; McCLELLAND, K.E.; TROWBRIDGE, F.L. & HUGHES, J.M. — Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. *J. infect. Dis.* 148(6): 986-97, 1983.
11. GUERRANT, R.L.; MOORE, R.A.; KIRSCHENFELD, P.M. & SANDE, M.A. — Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. *N. Engl. J. Med.*, 293: 567-73, 1975.
12. IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; NAKAHARA, L.K. & PESSÔA, G.V.A. — Isolamento de bactérias enteropatogênicas de coproculturas realizadas durante o período de 1977-1983 na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44 (2): 161-78, 1984.
13. JUIZ DE FORA. Departamento Municipal de Água e Esgoto. *Declaração*, 1987.
14. KANO, E.; PEIXOTO, E.S.; GONÇALVES, L.M.; CALZADA, C.T. & PESSÔA, G.V.A. — Isolamento de *Escherichia coli* invasora, em São Paulo, no período de junho de 1978 a dezembro de 1980. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 41(1): 37-41, 1981.
15. KEUSCH, G.T. & SCRIMSHAW, N.S. — Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XXIII. Control of infection to reduce the prevalence of infantile and childhood malnutrition. *Rev. infec. Dis.*, 8(2): 273-87, 1986.
16. LACERDA, M.D.; PONTES, J.D.C. & HOFER, E. — Circulação de enterobactérias patogênicas em menores institucionalizados: II — Estudo bacteriológico. *Rev. Microbiol.*, 19(2): 135-140, 1988.
17. LEVINE, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E. & CLEMENTS, M.L. — New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol. Rev.*, 47(4): 510-50, 1988.

OLIVEIRA, M.G.; PESSÔA, G.V. & NAKAHARA, L.K. — Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em crianças com diarreia no Município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):161-167, 1989.

18. MAGALHÃES, M.; ANDRADE, M. & CARVALHO, A.-E. — Pathogenic *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. *Rev. Microbiol.*, 12: 39-4, 1981.
19. MATA, L.; SOMHON, A.; PADILHA, R.; GAMBOA, M.M.; VARGAS, C.; HERNANDES, F.; MOHS, E. & LIZANO, C. — Diarrhea associated with rotaviruses, enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and other agents in Costa Rica children, 1976-1981. *J. trop. Med. Hyg.* 32(1): 146-53, 1983.
20. MINAS GERAIS, Secretaria de Estado do Planejamento e Coordenação Geral. PRODEMGE. — *População e mortalidade em Juiz de Fora*. Belo Horizonte, 1984.
21. MONTELLI, A.C. & TRABULSI, L.R. — Diarréias causadas por *Shigella*, *Salmonella* e *E.Coli* enteropatogênica no município de Boucatu, São Paulo. *Rev. Assoc. Med. bras*, 16: 23-4, 1970.
22. O.M.S. (1976). Abastecimento público de água y evacuación de águas residuales. *Crôn.O.M.S.*: 30. 356-82, 1976.
23. PESSÔA, 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 1970-1976. III. Sorotipos de *Shigella* e de *Escherichia coli* da gastroenterite infantil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38: 129-29, 1978.
24. PESSÔA, 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 sex-tênio 1977-82. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 43 (1/2). 97-103 1983.
25. PESSÔA, G.V.A.; IRINO, K.; KANO, E.; SIMONSEN, V. & NOGUEIRA, S. — Enteropatógenos em Santos: inquérito bacteriológico na população diarreica com mais de cinco anos de idade. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(1): 71-4, 1981.
26. QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; CISALPINO, E.O.; PERES, J.N. & PENNA, F.J. — Frequência de *Escherichia coli* enteropatogênica em crianças com diarreia aguda e em controles, em Belo Horizonte. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 16 (2): 95-100, 1985.
27. RIEDEL, O.O.; SOUZA, T.T. & NORONHA, M.C.C. — Contribuição à etiologia das diarreias agudas infantis em Fortaleza. *Rev. Med. Univ. Fed. Ceará* 21/22:47-54, 1982.
28. SACHS, A. apud EDWARDS, P.R. & EWING, W.H.G.
29. SERENY, B. — Experimental keratoconjunctivitis shigellosa. *Acta microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 4:367-76, 1955.
30. TAUNAY, A.E. — Bacteriologia das Shigeloses. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 11: 49-102, 1951.
31. TAUNAY, A.E.; CORREA, G.A. & FLEURY, C.T. — Frequência de alguns agentes microbianos nas chamadas "diarreias infantis" em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 5(2): 331-6, 1945.
32. TAUNAY, A.E.; NOVAES, J.R.C. & PESSÔA, G.V. A. — Infecções por enterobactérias no município de São Paulo. Provável disseminação por via aérea. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 113-6, 1971.
33. TIEMENS, K.M.; SHIPLEY, P.L.; CORREIA, R.A.; SHIELDS, D.S. & GUERRANT, R.L. — Emergence of sulfamethoxazole trimethoprim resistant *Shigella flexneri* in northeastern Brazil. *Arg. Gastroenterol.*, 22(4): 161-5, 1985.
34. VAN ZIJL W.J. — Studies on diarrhoeal diseases in seven countries by the WHO diarrhoeal diseases advisory team. *Bull. WHO*, 35: 249-64, 1966.
35. WALSH, J.A. & WARREN, K.S. — Selective primary health care: an interim strategy for disease control in developing countries. *N. Engl. J. Med.*, 301: 967-74, 1979.
36. WOOD, L.V.; WOLFE, W.H.; RUIZ-PALACIOS, G.; FOSHEE, W.S.; CORMAN, L.I.; McCLESKEY, F.; WRIGHT, J.A. & DuPONT, H.L. — An outbreak of gastroenteritis due to heat-labile enterotoxin-producing strain of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 41: 931-4, 1983.

Recebido para publicação em 27 de abril de 1989

EXPRESSION OF AVIAN LEUKOSIS VIRUS PROTEINS p27 AND p19 IN
UNINFECTED CHICKEN, DRAKE AND QUAIL CELLS

Júlia Maria Martins de SOUZA-FELIPPE*
Tomoko HIGUCHI**

RIALA6/675

SOUZA-FELIPPE, J. M. M. & HIGUCHI, T. - Expression of avian leukosis virus proteins p27 and p19 in uninfected chicken, drake and quail cells. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):169-178, 1989.

ABSTRACT: Normal, uninfected animal cells have a unique feature, the presence in their genome of genes (proviruses) identical or closely related to infectious exogenous retrovirus. The level of expression of these genes varies from individual to individual; from complete silence to the production of virus particles. Exogenous and endogenous virus proteins were purified from sonicated viruses passed through a Sepharose 6B column saturated with 6M guanidinium hydrochloride. The presence of equivalents of antigens p27 and p19 was analysed by radioimmunoassay. The presence of endogenous virus components was investigated in CEF, heart, brain, thigh muscle and wing muscle of chicken, quail and drake. The function or significance of the proteins are not known. Immunological, hormonal and environmental factors remain to be studied.

DESCRIPTORS: Retrovirus; Endogenous virus; virus endogenous expression; RIA.

INTRODUCTION

The retrovirus exhibits a unique feature, their complete genome or some of their genes might be present in uninfected, normal cells. This chromosome segment is named endogenous and it is widely distributed in nature, having been characterized not only in birds but also in mammals. Its existence was first reported by DARLINGTON, 1948¹⁵ as provirus, a cellular genetic element activated under special circumstances. More careful studies concerning the presence of information specifying the genome of an RNA tumor virus in normal cells were carried out by HUEBNER & TODARO²¹. The virus specific DNA was proposed to be vertically transmitted and portions of the genome were proposed to be expressed during certain stages of the development. The authors assumed that in normal adult cells the transcription of the genes would be repressed.

HANAFUSA et al.²⁰ reported that fibroblasts from certain normal chicken embryos were able to complement the defectiveness of the RSV Bryan strain releasing infectious particles. The fibroblasts contained one component, then called chicken helper factor (chf), later on characterized as an envelope glycoprotein encoded by endogenous viruses present in these cells. VOGT & FRISS²⁹ found spontaneous release of RAV-O viruses from certain chicken embryo cell lines. This observation led to the conclusion that the endogenous genome by itself is certainly defective; these studies were corroborated by several authors^{6,20,42,48,58}. Later on, the presence of this envelope glycoprotein was detected in the majority of commercial flocks of chicken. Due to the ubiquitous presence of the glycoprotein, it was suggested to be harmless to the host organism and even be advantageous in certain cases by protecting the host against exogenous infection⁶⁰.

* Do Laboratório de Biologia Molecular, Virologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, São Paulo, SP.

In regard to the presence of the helper factor and group specific antigen (gs), HANAFUSA et al.²² and ROBINSON²⁷ identified three different phenotypes in chicken embryos: gs+chf+ showing both properties; genetic experiments showed the segregation of two single dominant alleles; gs⁻ - chf⁺ or h-e do not show detectable levels of gs but high levels of helper activity; and gs⁻ chf⁻ which show either very low or undetectable level of both characters. Hybridization experiments conducted with specific probes showed the absence in the genome of U3-region related to exogenous virus in the chicken fibroblasts analysed³². Curiously, the cells containing env-3 do not express the structural viral component p15. So far, it has been recognized 16 endogenous species.

The distribution of the endogenous virus differs tremendously in different species as well as in the same species. Moreover, the phenotype expression covers a wide range, going from complete silence, expression of one component until the production of a full particle. The explanation of this phenomenon is not known, although some hypothesis have been postulated, like the difference in the level of expression might be due to provirus mutation or chemical modification of the provirus genome. Methylation has been shown to be an important modification^{12,23,33,54}, the relevance of the process was shown by using 5-azocytidine. JONES & TAYLOR³⁵; GROUDINE et al.¹⁹ proposed the methylation as a cell mechanism to repress the expression of undesirable genes.

Hybridization experiments have shown the presence of analogous retrovirus genes in germ lines of primates. VARMUS & LEVINE (1983)⁵⁶ raised several questions about endogenous viruses. "Do they arise from normal cellular genes? Are they derived in different species from a primordial endogenous provirus in an ancestral vertebrate? Do they find their way into germ lines by intermitent, independent infectious? What are the benefits and dangers to a host organism that carries endogenous proviruses?"

In the present work, we have tried the purification of endogenous virus antigens and their comparison with the profiles obtained with exogenous virus particles. The approach used to measure the expression of these protein was the radioimmunoassay. The expression of endogenous virus components mainly, p27 and p19, were studied in chicken embryo fibroblasts and extracts of chicken tissues and organs. Quail and drake cellular extracts were also analyzed and the identity of p27 and p19 in different systems was investigated.

MATERIAL AND METHODS

Virus purification

Avian fibroblasts culture supernatants were clarified by low speed centrifugation (3,500 xg/30 min./4°C); the supernatants were submitted to ultracentrifugation (100,000 xg/90min/4°C) to separate virus particles. The pellet resuspended in PBS (phosphate saline buffer = 120 mM sodium chloride; 18 mM disodium phosphate and 2.5 mM potassium monobasic phosphate) was layered onto a 20 to 60% sucrose-TRIS (10 mM pH 7.4) gradient. After centrifugation at 100,000 xg/10°C for 180 minutes, the fractions of the gradient were collected and these fractions were recentrifuged at 110,000 xg/90min/4°C. The combined pellets were resuspended in PBS and dialysed against buffer containing 40 mM TRIS.HCl pH 7.4; 20 mM sodium acetate and 1mM EDTA.

Isolation and purification of structural proteins

Virus particles were disrupted in the presence of TNE-TRITON X-100 0.2% by sonication and the sample was suspended in buffer containing 8M guanidine-hydrochloride; 1.5 M beta-mercaptoethanol and 5 mM EDTA pH 8.0. The virus extract was applied to a column of Sepharose 6B-guanidine hydrochloride and eluted with buffer containing 50 mM sodium acetate pH 5.0; 20 mM beta-mercaptoethanol and 6 M guanidine hydrochloride according to the procedure previously described by GREEN & BOLOGNESI¹⁸.

Protein determination

The protein was determined either by LOWRY et al.³⁸ method or BRADFORD⁹ for samples containing guanidine hydrochloride. Bovine serum albumin was used as standard based on $E_{280}^{1\%} = 6.6$.

Polyacrylamide sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis (PAGE)

The gel electrophoresis system used were either at 12.5% polyacrylamide concentration or 5-20% gradient according to the technique described by LAEMMLI³⁶ and MAIZEL⁴⁰. High and low molecular weight standards were used as markers.

Cell lines, tissues and extracts preparation

CEF-commercially available chicken embryo fibroblasts culture; CEF-7.2-chicken embryo fibroblasts line 7 subline 2; brain, heart, thigh and wing muscle from 5 months old chicken (*Gallus gallus domesticus*), 30 days old quail (*Nothura maculosa*) and 30 days old drake (*Anas platyhynchos*).

The tissues and organs were removed immediately after bird killing; the fat was taken out and the tissues and organs were kept in an ice bath. The material was minced and homogenized in the presence of TNE buffer containing 1mM PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride) and TRITON X-100 0.2%. The excess of debris was discarded and the supernatant centrifuged at 1,500 xg/30min./4°C and then 10,000 xg/60min./4°C. To clean up the extracts, the supernatants were centrifuged at 80,000xg/60min/4°C and the final supernatants were used as "cellular extracts" in the assays.

Radioimmunoassay

The viral and to procedures purified proteins were labelled with ¹²⁵I-Na according to HUNTER³⁴, according to technique described elsewhere^{27,28}. These techniques allowed the time of reaction to be reduced to 30 seconds.

Immune serum titre - The titre was defined as the serum dilution giving 50% precipitation of labelled antigen under specified conditions. Constant amount of labelled antigen plus several dilutions of immune serum plus normal rabbit serum were incubated at 37°C for 3 hours and the reaction completed at 4°C overnight, then the precipitating sheep antibodies or goat anti-rabbit IgG were added. The reaction was allowed to precipitate at 4°C/overnight and subsequently submitted to centrifugation at 3,500 xg/20min: the pellet was washed twice with cold TNE and the radioactivity of the pellet measured in a gamma counter.

Competition assay - The competition assay of the proteins of cellular extracts were performed in a system similar to the precipitation reaction, with the addition of cellular extracts. The amount of the equivalent of antigen present in the cellular extract was calculated by comparison with a standard competition curve prepared by using known amounts of unlabelled protein as competitor in the above experimental conditions.

RESULTS

Purification of viruses particles

The virus particles separated from culture fluids when submitted to sucrose gradient ultracentrifugation showed different banding patterns depending whether the virus, was exogenous or endogenous. The exogenous viruses formed only one layer around the sucrose concentration of 35%, which is equivalent to a density of 1.16 - 1.18g/ml^{7,8}. The endogenous viruses presented besides the main layer at the concentration of 35%, second band at around 20% and a third

layer (lower) between the sucrose concentration of 50 and 60%. In addition, both endogenous viruses 1515 and 7.2 presented similar protein profiles in PAGE on a gel gradient 5 to 20% (figure 1). Compared with the molecular weights markers, 200 K = myosin; 150 K = immunoglobulin; 90 K = phosphorilase B; 45 K = ovalbumin; 30 K = carbonic anhydrase; 20 K = trypsinogen and 15 K = beta-lactoglobulin, we could detect the presence of several components gp85, gp35, p27, p19, p15, p12 and probably a reverse transcriptase line in the 90 K region. The electrophoresis profiles showed that the layer at 35% contained the complete virus or intact virus particles.

The table 1, presents the protein content of the virus samples obtained after sucrose gradient centrifugation. The viruses concentrated in the main layer were used for further processing.

Radioimmunoassay

The purified antigens p27, p19 and p15 from exogenous ALV were successfully labelled with ¹²⁵I-Na according to HUNTER³⁴ procedure, giving specific activities between 2 to 3 x 10⁴ cpm/ng protein.

Immune serum titration - Each immune serum was titrated in a system containing 0.02 ml ¹²⁵I-p (40 - 50,000 cpm); 0.02 ml Anti-p in serial dilu-

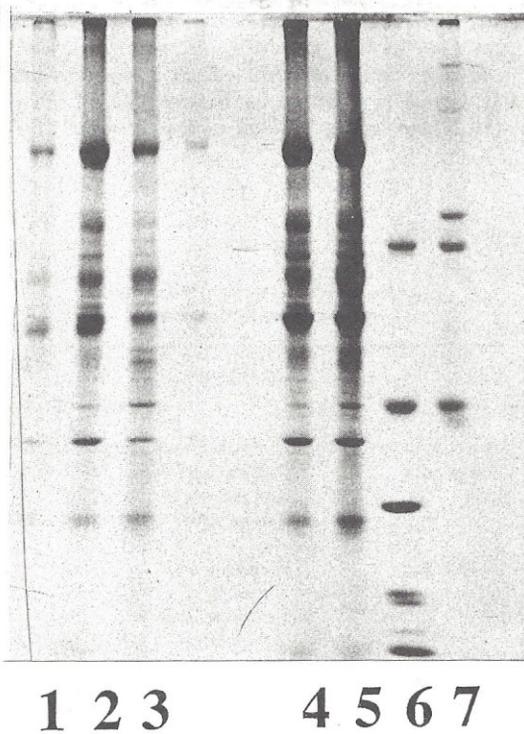
TABLE 1
Sucrose gradient virus purifications:
protein determination

VIRUS	SAMPLE ^a	TOTAL PROTEIN ^b mg
Endogenous 1515	Crude extract	4.50
	Upper layer	2.00
	Lower layer	1.94
Endogenous 7.2	Crude extract	9.00
	Upper layer	1.30
	Intermediate layer	3.84
	Lower layer	2.76
Avian leukosis Virus (exogenous)	Crude extract	4.50
	Virus layer	4.00

- (a) Virus purification carried out by sucrose gradient ultracentrifugation at 110,000g/90min/10°C of the virus suspension.
(b) Protein determination according to LOWRY et alii 38 referred to in Methods.

tions; 0.03 ml NRS (dil.1:3) TNE buffer to complete the volume to 0.250 ml; a first incubation 37°C/3hr was followed by an overnight incubation at 4°C; the addition of 0.03 ml GAR or SAR (dil. 1:36) and then a precipitation to completion at 4°C/overnight. The pellet was collected by centrifugation at 3,500 xg/20min., washed twice and the radioactivity was measured in the gamma counter. Under the experimental conditions used, the following titre were obtained: Anti-p27 = 1:2,000, Anti-p19 = 1:4,000 and Anti-p15 = 1:5,000 (table not shown).

The standard competition curve was used to determine the concentration of the equivalents of antigen present in the system. It was prepared by using as standard competitor unlabelled purified antigen in several concentration. It was allowed to compete with fixed amounts of labelled antigen, in the combination with the antibody present in limited concentration under defined experimental conditions. The figure 2 shows the standard curves of antigens p27, p19 and p15 in the system ¹²⁵I-p vs Anti-p respectively.



PICTURE 1 - Polyacrylamide sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis (5-20% gradient) of virus extracts. Lanes 1: Endogenous 1515-sucrose gradient upper layer; 2: E-1515 - lower layer; 3: E-1515 - supernatant; 4: Endogenous 7.2 - upper layer; 5: Endogenous 7.2 - lower layer; 6 and 7: Molecular weight standards.

The purification of proteins from exogenous virus particles was carried out Sepharose 6B-saturated with 6 M guanidine - hydrochloride under very special conditions (see Methods). The components were nicely separated exactly as shown by GREEN & BOLOGNESI¹⁸. Unfortunately, the purification of endogenous virus components could not be done in the same experimental conditions, since the behaviour is not alike, giving an indication of the difference in the properties of the components. Instead of giving distinct peaks in the Sepharose column as in the case of exogenous virus, the collected fractions from endogenous contained all three major antigens, detected by radioimmunoassay. As shown in the

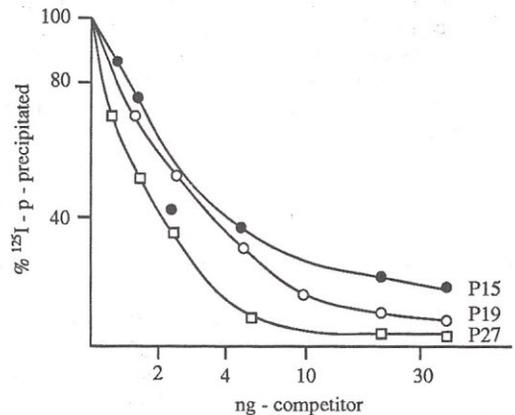
TABLE 2

Protein concentration of fractions eluted from Sepharose 6B-GuHCL column

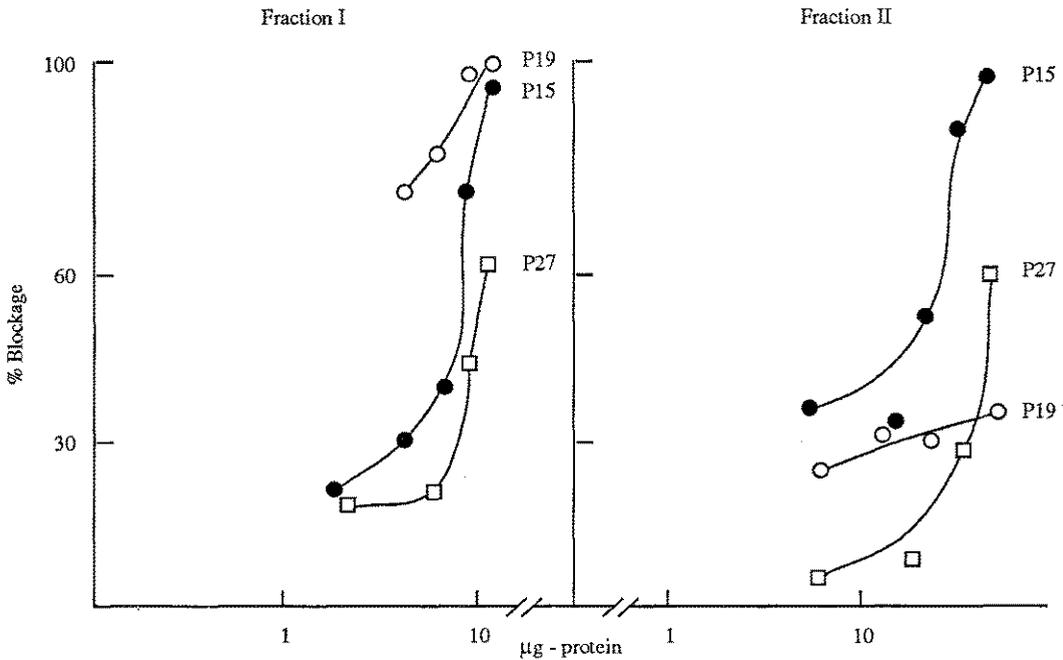
SAMPLE ^a	TOTAL PROTEIN ^b mg
Crude extract	8.00
Fraction I	0.93
Fraction II	4.68
Fraction III	1.72

(a) 9.0 mg of virus extract disrupted and applied to Sepharose 6B-GuHCL column (1.4 x 100 cm) eluted with 20 mM sodium phosphate buffer ph 6.5 containing 0.1% beta-mercaptoethanol and 6M-GuHCL.

(b) Protein content evaluated by BRADFORD method as referred to in Methods.



PICTURE 2 - Standard competition radioimmunoassay: Assay carried out according to description in Materials and Methods. ¹²⁵I-p vs Anti-p in dilution equivalent to serum titre vs unlabelled protein, amount indicated in the Figure; precipitation with second antibody and collected pellet radioactivity measured in gamma counter.



PICTURE 3 - Detection of components in the fractions I and II eluted from Sepharose 6B-GuHCl column: Competition assay according to procedure described in "Methods", ¹²⁵I-p vs Anti-p vs different amount of fraction I and II; precipitation with second antibody; radioactivity of the pellets determined in gamma counter.

TABLE 3

Competition assay: ¹²⁵I-p27 vs Anti-27 vs chicken embryo fibroblasts

Competitor ^a µg	Precipitation ^b %	Blockag ^c %
10	98.9	1.1
30	88.7	11.3
60	76.4	23.6
80	72.2	27.8
180	54.4	45.6

- (a) Chicken embryo fibroblasts suspension sonicated in the presence of TRITON X-100 0.2% in the presence of 1mM PMSF. Suspension centrifuged at 1,500 xg/20min/4°C. Further centrifugations at 10,000 xg/60min/4°C. The supernatant was used as "extract".
- (b) The competition assay was carried out in a system containing 0.03 ml NRS dil 1:3; 0.02 ml Anti-p27 dil 1:2,000; 0.02 ml ¹²⁵I-p27; competitor in the indicated concentration, TNE . 2 to volume 0.25 ml and 0.03 ml GAR dil 1:250. Pellet collected by centrifugation and the amount of radioactivity of the pellet measured in gamma counter. 100% precipitation is the cpm obtained in a tube without any competitor.
- (c) The percentage of blockage is calculated by subtracting from 100 the percentage of precipitation in the column².

figure 3, both fractions contained similar amounts of p27 and p15 although the p19 was present mainly in the first fraction. The distribution is indicative of the difficulties of having the antigens purified by Sepharose 6B-guanidine - hydrochloride procedure, for sure more careful studies of the nature of the endogenous virus proteins should be done.

The expression of the equivalents to epitopes of antigens p27, p15 and p19 in chicken embryo fibroblasts were measured in the system analogous to the standard competition assay except in this case the competitor was the extract of chicken embryo fibroblasts. We found very high level of analogous to p27 and also expression of components analogous to p15, indicating the presence of endogenous provirus in the so called normal cells. As shown in the table 3, 30 µg of chicken embryo fibroblasts blocked the precipitation reaction in about 11,3%, what is equivalent to 5 ng of p27. On the other hand, 40 µg contained about 3 ng of p15.

Several authors^{1,6,11,39} had shown the expression of certain viral genomic region in the embryogenesis but their activity seems to be repressed in the adulthood. There are difference in

TABLE 4

Competition of normal cells from chicken, quail and drake in the system ^{125}I -p Anti-p

Competitor		ng of equivalents	
		p19	p27
Brain	Chicken	5.0	17.5
	Quail	36.8	33.08
	Drake	32.3	—
Heart	Chicken	4.8	10.0
	Quail	zero	zero
	Drake	58.8	44.3
Wing muscle	Chicken	2.1	9.3
	Quail	24.5	8.3
	Drake	39.5	8.7
Tight muscle	Chicken	3.0	4.0
	Quail	46.5	10.5
	Drake	—	29.9

SYSTEM: Cellular or tissue extracts in several protein concentration: 0.06 ml NRS dil. 1:3; 0.02 ml of ^{125}I -p (40-45,000 cpm); 37°C/3h; 4°C overnight; 0.06 ml SAR: 4°C/overnight; collected and counted. Table calculated by normalizing all competitor protein concentration to 5.0 mg in order to compare the level of competition.

the level of repression depending on the tissue differentiation level. In our experiments there were a variation of equivalent to viral antigens, depending not only on the tissues but also on the source of chicken tested, giving a clue of the importance of the environmental conditions and the species of bird used. Very little variation in the amount of p27 and p15 was found in tight muscle using competitor in the range of 75 to 300 mg. On the other hand, brain and heart extracts showed considerable level of p27 (table 4). The reaction was highly specific, there were no inespecific precipitations, in all assays individual controls were carried out.

Cellular extracts from quails were tested in a system similar to chicken cells, in other words, brain, heart, tigh and wing muscles were used as competitor. Higher expression of p27 analogous was found in tigh muscle and then wing muscle, but no competition was found in heart and brain tissues (table 4).

When drake cells extracts were used, there were no significant variation in the level of p19 in brain, heart and wing muscle. But, the heart muscle showed the blockage of 28.73% when 394.4 μg of tissues was used in the system ^{125}I -p27 vs Anti-p27 vs heart muscle extract (table 4).

DISCUSSION

Several attempts have been made in order to set the viral andogenous structural components of avian retrovirus in the purified form, without much success. GREEN & BOLOGNESI¹⁸ improved the separation procedure for viral exogenous antigens by using agarose gel column in the presence of 6M-guanidine hydrochloride. This approach was used previously in order to determine the protein molecular weight through a simple relationship of chain lenght and elution volume in the solvent.

We used Sepharose 6B column saturated with 6 M-Gu-HCl, which made the gel system very viscous, being so, it was necessary to adjust the flow rate in order to get adequate separation. The protein diffusion coefficient in 6 M-GuHCl is usually very low, close to the native protein. The protein renaturation was achieved by dialysis against a solution containing beta-mercaptohetanol and EDTA (see Methods). The viral exogenous antigens were nicely separated by this procedure (see Results).

In order to standardized the abbreviations used in the field AUGUST et al.⁴ suggested a standard nomenclature for virus components: p for protein; gp for glycoprotein; pp for phosphoprotein and Pr for precursors because of the diversity of abbreviations by several authors.

HIGUCHI²⁶, HIGUCHI & AUGUST^{27,28} tried to correlate the appearance of detectable group specific antigen and cellular transformation, surprisingly at that time they were simultaneous, the appearance of group specific antigen seemed to be essential for exogenous virus replication but not enough to start cell transformation. The importance of p27 of avian system and p30 of murine virus was extensively studied by Higuchi²⁶ and HIGUCHI & AUGUST^{27,28}.

Several groups of investigators^{8,21,26,27,28,30,43,49,51,52} developed the radioimmunoassay in order to detect minimal amount of viral antigen or its equivalent in a system, and also to investigate the expression of viral genes present in the host cell.

We used the competition radioimmunoassay in order to detect the expression of antigens or its equivalents. We investigated the expression and the level of the presence of equivalents to p27 and p19 in several tissues and organs of adult chickens as well as in chicken embryo fibroblasts. Since the ability to detect them depends on the amount of competitor used no competition was found at protein concentration in the range of 0.1 to 0.2 mg. However, when the

amount of competitor, in the experimental conditions was increased, epitopes of p27 and p19 were detected¹⁷ as shown in table 4 and also of p15 (date no shown).

When the system ¹²⁵I-p27 vs Anti-p27 vs cellular extracts were used, 3.85 mg of chicken brain material blocked 50% the precipitation reaction, it was equivalent to 28 ng of p27. On the other hand, almost twice as much 5.52 mg of heart extract was necessary to give the same inhibition. Surprisingly, thigh muscle and wing muscle did not show significant competition for any of labelled antigens.

The p19 is associated with genomic RNA and is linked to lipids and the outer core. Sometimes it is phosphorylated. It might be important for RNA packaging^{16,37,45,50}.

A different pattern of expression was found for p19 expression; all sample analysed showed competition, which might be due to some similarity between the p19 and some cellular components, although the control values were taken into account.

When the same tissues and organs extracts from quail and drake were analysed, similar competition pattern were found, although at different protein concentrations. The experimental results suggest more similarity between the endogenous proteins of chicken and drake than with the quail proteins. Moreover, the radioimmunoassay results showed satisfactory immunological reaction with the exogenous virus antigens p27, p19 and p15 and the endogenous components, which strengthens the assumption that the *gag* genes are conserved among avian retrovirus.

Making several crosses among white Leghorn chickens, CRITTENDEN¹⁴ isolated cell strains, 5.7 and 17 carrying a dominant gene predisposing the cell to spontaneous activation of endogenous viruses genomes. The line 7.2 is homozygous for the gene V-E7 and lacks the dominant host gene Gs and H-E. The line 15 is inducible it produces non infectious particles by BrdU treatment⁴⁷ and it is an unique line.

MARTIN et al.³⁹ reported the recovery of endogenous retrovirus from baboon, stump-tail macaque and colobus, but, so far, endogenous retroviral DNA has not been detected in preparations with normal human DNA probes.

There are considerable amount of speculations about the mechanisms used for integrative recombination of retroviral DNA in the cellular chromosome. Surely, there must be an endogenous control, that could be broken by one or combination of immunological, hormonal, environmental factors; mutagenic elements^{10,57} promotion of transcription of cellular DNA^{41,44,46}, oncogenes^{25,41} and transposons^{1,13,33}. It seems to be particularly important the region of insertion because it might promote or activate the full expression of relevant genes.

Acknowledgement

We would like to express our gratitude to Prof. Dr. A.A. Pupo (Medical School - USP) for his kindness in allowing us to use the gamma counter. The culture fluid was kindly supplied by Dr. C.H. Romero (EMBRAPA). The laboratory was set up because of the FAPESP grants ns. 81/0215-4, 82/1592-9 and 84/0384-9.

SOUZA-FELIPPE, J. M. M. & HIGUCHI, T. — Expressão das proteínas p27 e p19 de vírus de leucose aviária em células não infectadas de galinha, pato e marreco. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):169-178, 1989.

RESUMO: Células animais normais, não infectadas, apresentam uma característica única; a presença em seu genoma de genes (provírus) idênticos ou estritamente relacionados a retrovírus exógenos infecciosos. O nível de expressão destes genes varia de indivíduo para indivíduo: do silêncio completo até a produção de partículas virais. Proteínas de vírus endógenos e exógenos foram purificadas a partir de vírus sonicados e passados em coluna de Sepharose 6B saturada com GuHCl 6M. A presença de equivalentes dos antígenos p27 e p19 foi analisada por radioimunoensaio. A presença de componentes de vírus endógenos foi investigada em CEF, coração, cérebro, músculo de asa e músculo de coxa de galinha, codorna e marreco. A função ou significado destas proteínas é desconhecida. Fatores ambientais, hormonais e imunológicos necessitam ser estudados.

DESCRITORES: Retrovírus; vírus endógeno; expressão de vírus endógenos; RIA.

REFERENCES

1. ASTRIN, S. M. - Endogenous viral genes of white Leghorn chickens: common site of residence and sites associated with specific phenotypes of viral gene expression. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 75: 5941-5, 1978.
2. ASTRIN, S. M., CRITTENDEN, L. B. & BUSS, E. G. - ev-2, a genetic locus containing structural genes for endogenous virus, codes for Rous-associated virus type-O produced by line 72 chickens. *J. Virol.*, 33: 250-5, 1980.
3. ASTRIN, S. M. & ROBINSON, H. L. - Gs, an allele of chicken for endogenous avian leukosis viral antigens, segregates with ev-3, a genetic locus that contains structural genes for virus. *J. Virol.*, 31: 420-5, 1979.
4. AUGUST, J. T., BOLOGNESI, D. P., FLEISSNER, E., GILDEN, R. V. & NOWINSKI, R. C. - A proposed nomenclature for the virion proteins of oncogenic RNA viruses. *Virology*, 60: 595-601, 1974.
5. BAKER, B., ROBINSON, H. L., VARMUS, H. E. & BISHOP, J. M. - Analysis of endogenous avian retrovirus DNA and RNA: viral and cellular determinants of retrovirus gene expression. *Virology*, 144: 8-22, 1981.
6. BALUDA, M. A. - Widespread presence in chickens of DNA complementary to RNA genome of avian leukosis virus. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 69: 576-80, 1972.
7. BAUER, H. & BOLOGNESI, D. P. - Polypeptides of avian RNA tumor viruses. II. Serological characterization. *Virology*, 42: 1113-26, 1970.
8. BOLOGNESI, D. P. & BAUER, H. - Polypeptides of avian RNA tumor viruses. I. Isolation and physical and chemical analysis. *Virology*, 42: 1097-112, 1970.
9. BRADFORD, M. M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-54, 1976.
10. CALOS, M. P. & MILLER, J. H. - Transposable elements. *Cell*, 20: 579-95, 1980.
11. CHARMAN, H.; KIM, N. & GILDEN, R. V. - Radioimmunoassay for the major structural protein of hamster type-C viruses. *J. Virol.*, 14: 910-7, 1974.
12. COHEN, J. C. - Methylation of milk-borne and genetically transmitted mouse mammary tumor virus proviral DNA. *Cell*, 19: 653-66, 1980.
13. COHEN, J. C. & VARMUS, H. E. - Endogenous mammary tumor virus DNA varies among wild mice and segregates during inbreeding. *Nature*, 278: 418-23, 1979.
14. CRITTENDEN, L. B.; SMITH, E. J.; WEISS, R. A. & SARMA P. S. - Host gene control of endogenous avian leukosis virus production. *Virology*, 57: 128-38, 1974.
15. DARLINGTON, C. D. - The plasmagene theory of the origin of cancer. *Br. J. Cancer*, 2: 118-26, 1948.
16. DARLIX, J. L. & SPAHR, P. F. - Binding sites of viral protein p19 onto Rous sarcoma virus RNA and possible controls of viral functions. *J. Mol. Biol.*, 160: 147-61, 1982.
17. FELIPPE, J. M. M. S. - Caracterização das proteínas estruturais dos retrovírus de aves: purificação, avaliação da reatividade imunológica e grau de expressão em células normais. Ph.D. Thesis presented to University of São Paulo - Brazil (1985).
18. GREEN, R. W. & BOLOGNESI, D. P. - Isolation of proteins by gel filtration in 6M guanidinium chloride: application to RNA tumor viruses. *Anal. Biochem.*, 57: 108-17, 1974.
19. GROUDINE, M., EISENMAN, R. & WEINTRAUD, H. - Chromatin structure of endogenous retroviral genomes and activation by an inhibitor of DNA methylation. *Nature*, 292: 311-7, 1981.
20. HANAFUSA, T., HANAFUSA, H., MIYAMOTO, T. - Recovery of a new virus from apparently normal cells by infection with avian tumor viruses. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 67: 1797-803, 1970.

21. HANAFUSA, T.; HANAFUSA, H.; MIYAMOTO, T. & FLEISSNER, E. - Existence and expression of tumor virus genes in chick embryo cells. *Virology*, 47: 775-82, 1972.
22. HANAFUSA, H.; HANAFUSA, T.; KAWAIS, S. & LUGINBUHL, R. E. - Genetic control of expression of endogenous virus genes in chicken cells. *Virology*, 58: 439-48, 1977.
23. HARBERS, K.; SCHNIKE, A.; STUHLMANN, H.; JÄHNER, D. & JAENISCH, R. - DNA methylation and gene expression: endogenous retroviral genome becomes infectious after molecular cloning. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 78: 7609-13, 1981.
24. HAYWARD, W. S.; BRAVERMAN, S. B. & ASTRIN, S. M. - Transcriptional products and DNA structure of endogenous avian provirus. *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 44: 1111-21, 1980.
25. HAYWARD, W. S.; NEEL, B. G. & ASTRIN, S. M. - Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature*, 290: 475-80, 1981.
26. HIGUCHI, T. - Caracterização imunológica, por radioimunoensaio das proteínas estruturais dos vírus tumorais do tipo-C. São Paulo, 1975.p. Tese de Livre-Docência - Instituto de Química, USP.
27. HIGUCHI, T. & AUGUST, J. T. : Characterization of tumor virus proteins. I. Radioimmunoassay of the p27 protein of avian viruses. *Rev. bras. Pesq. med. biol.*, 10: 1-14, 1977.
28. HIGUCHI, T. & AUGUST, J. T. - Characterization of tumor virus proteins. II. Expression of the protein p30 in transformed productive and non-productive Ki/NKR cells. *An. Acad. bras. Ciênc.*, 49: 337-47, 1977.
29. HISHINUMA, F.; DeBONA, P. J.; ASTRIN, S. & SKALKA, A. M. : Nucleotide sequences of the acceptor site and termini of integrated avian endogenous provirus ev-1: Integration creates a 6pb repeat of host DNA. *Cell*, 23: 155-64, 1981.
30. HUEBNER, R. M.; KELOFF, G. J.; SARMA, R. S.; LANE, W. T. & TURNER, H. C. - Group specific antigen expression during embryogenesis of the genome of the C-type tumor virus: Implications for ontogenesis and oncogenesis. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 67: 366-76, 1970.
31. HUEBNER, R. J. & TODARO, G. J. - Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 64: 1087-94, 1969.
32. HUGHES, S. H.; VOGT, P. K.; BISHOP, J. M. & VARMUS, H. E. - Endogenous proviruses of random-bred chickens and ring-necked pheasants: analysis with restriction endonucleases. *Virology*, 108: 222-9, 1981.
33. HUMPHRIES, E. H.; GLOVER, C.; WEISS, R. A. & ARRAND, J. R. - Differences between the endogenous and exogenous DNA sequences of Rous-associated virus-O. *Cell*, 18: 803-15, 1979.
34. HUNTER, W. M. - The preparation of radiolabeled proteins of high activity, their reaction with antibody in virus: The radioimmunoassay. In: WEIR, D. M. - *Handbook of experimental immunology*, Philadelphia, F. A. DAVIS ed., 1966. p. 608-42.
35. JONES, P. A. & TAYLOR, S. M. - Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, 20: 85-93, 1980.
36. LAEMMLI, U. K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-5, 1970.
37. LEIS, J. P.; MCGINNIS, J. & GREEN, R. W. - Rous sarcoma virus p19 binds to specific double-stranded regions of viral RNA: effect of p19 on cleavage of viral RNA by RNase III. *Virology*, 84: 87-98, 1978.
38. LOWRY, O. H.; ROSENBOUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDAL, R. J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 192: 265-75, 1951.
39. MAIZEL, J. V. - Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. *Methodo Virol.*, 5: 180-244, 1971.
40. MARTIN, M. A.; BRYAN, T.; RASHEED, S. & KHAN, A. S. - Identification and cloning of endogenous retroviral sequences present in human DNA. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 78: 4992-6, 1981.
41. NEEL, B. G.; HAYWARD, W. S.; ROBINSON, H. L.; FANG, J. & ASTRIN, S. M. - Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete viral RNAs: oncogenesis by promoter insertion. *Cell*, 23: 323-34, 1981.
42. NEIMAN, P. E. - Measurement of endogenous leukosis nucleotide sequences in the DNA of normal avian embryos by RNA-DNA hybridization. *Virology*, 53: 196-204, 1973.
43. OROSLAN, S. & GILDEN, R. V. - Primary structure analysis of retrovirus proteins. In "Molecular Biology of RNA tumor viruses" (J. R. STEPHENSON, ed) pp. 299-344, Academic Press, N.Y. 1980.
44. PAYNE, G. S.; COURTNEIDGE, S. A.; CRITTENDEN, L. B.; FADLY, A. M.; BISHOP, J. M. & VARMUS, H. E. - Analysis of avian leukosis virus DNA and RNA in bursal tumors: viral gene expression is not required for maintenance of the tumor state. *Cell*, 23: 311-22, 1981.
45. PEPINSKY, R. B. & VOGT, V. M. - Identification of retrovirus matrix proteins by lipid-protein cross-linking. *J. mol. Biol.*, 131: 819-37, 1979.
46. QUINTRELL, N.; HUGHES, S. H.; VARMUS, H. E. & BISHOP, J. M. - Structure of viral DNA and RNA in mammalian cells infected with avian sarcoma virus. *J. mol. Biol.*, 143: 363-93, 1980.
47. ROBINSON, H. L. - Inheritance and expression of chicken genes which are related to avian leukosis sarcoma virus genes. *Curr. Top. Microbiol.*, 53: 1-36, 1978.
48. ROSENTHAL, P. N.; ROBINSON, H. L.; ROBINSON, W. S.; HANAFUSA, T. & HANAFUSA, H. - DNA in uninfected and virus-infected cells complementary to avian tumor virus RNA. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 68: 2336-40, 1971.
49. SCHAFFER, W.; FISCHINGER, P. J.; LANGE, J. &

- PISTER, L. - Properties of mouse leukemia viruses. I. Characterization of various antisera and serological identification of viral components. *Virology*, 47: 197-209, 1972.
50. SEN, A. & TODARO, G. J. - The genome-associated specific RNA binding proteins of avian and mammalian type C viruses. *Cell*, 10: 91-9, 1977.
51. SOUZA, J. M. M. & HIGUCHI, T. - Estudo comparativo dos determinantes antigênicos das proteínas estruturais dos retrovírus de aves. I. Isolamento e purificação das proteínas. *Arq. Biol. Tecnol.*, 24: 155, 1981.
52. SOUZA, J. M. M. & HIGUCHI, T. - Studies of the p15 structural proteins of avian myeloblastosis virus. *Arq. Biol. Tecnol.*, 26: M27-308, 1983.
53. STRAND, M. & AUGUST, J. T. - Structural proteins of mammalian oncogenic RNA viruses multiple antigenic determinants of the major structural protein and envelope glycoprotein. *J. Virol.*, 13: 171-80, 1974.
54. STUHLMAN, H., JAHNER, D.; JAENISCH, R. - Infectivity and methylation of retroviral genomes is correlated with expression in the animal. *Cell*, 26: 221-32, 1981.
55. TEMIN, H. M. - The RNA tumor viruses-Background and Foreground. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 69: 1016-20, 1972.
56. VARMUS, H. & LEVINE, A. J. - Readings in tumor virology. Cold Spring Harbor Laboratory (1983).
57. VARMUS, H. E.; QUINTRELL, N. & ORITZ, S. - Retrovirus as mutagens: insertion and excision of a nontransforming provirus alter expression of a resident transforming provirus. *Cell*, 25: 23-36, 1981.
58. VOGT, P. K. - Genetics of RNA tumor viruses. In: Comprehensive virology (ed. H. FRAENKEL-CONRAT and R. R. WAGNER), New York, Plenum Press, 1977. v. 9. p. 341-455.
59. VOGT, P. K. & FRIIS, R. R. - An avian leukosis virus related to RSV(O) : Properties and evidence for helper activity. *Virology*, 43: 223-34, 1971.
60. WEISS, R. A. & BIGGS, P. M. - Leukosis and marek's diseases of feral red jungle fowl and domestic fowl in malaya. *J. natl. Cancer Inst.*, 49: 1713-25, 1972.

Recebido para publicação em 17 de maio de 1989.

SISTEMA DIGESTOR PARA DESTRUIÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA EM ANÁLISE DE ALIMENTOS*

Alice Momoyo SAKUMA**
Jorge José do Vale OLIVEIRA**
Odair ZENEBO**
Paulo TIGLEA**
Maria Anita SCORSARAVA**

RIALA6/676

SAKUMA, A.M.; OLIVEIRA, J.J.V., ZENEBO, O.; TIGLEA, P. & SCORSARAVA, M.
A. — Sistema digestor para destruição de matéria orgânica em análise de
alimentos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (2):179-182, 1989.

RESUMO: É proposto um sistema simples para mineralização, por via úmida, de amostras de alimentos contendo matéria orgânica. Foram testados vários tipos de alimentos e constatou-se que a aparelhagem apresenta eficiência e vantagem em relação aos métodos normalmente utilizados para destruição de matéria orgânica nas determinações de contaminantes metálicos em alimentos.

DESCRIPTORIOS: matéria orgânica, sistema simples para destruição; alimentos, destruição de matéria orgânica; contaminantes metálicos, determinação em alimentos.

INTRODUÇÃO

Nas determinações de contaminantes metálicos em alimentos, qualquer que seja o método utilizado para quantificá-los, uma das etapas limitantes é a destruição da matéria orgânica.

Diferentes métodos para eliminação de material orgânico são propostos para cada tipo de alimento e para cada íon inorgânico a ser analisado. Estão baseados em procedimentos que envolvem tratamento por via seca ou por via úmida^{3,5,6,7,8,9,10}.

Na destruição de matéria orgânica por via seca utiliza-se mufla com temperatura controlada. A técnica é demorada e apresenta o inconveniente de provocar perdas, por volatilização, de alguns metais a serem determinados, além de requerer a utilização de cápsulas de platina ou de porcelana de ótima qualidade^{1,2,10}. Para contornar estas situações adversas, pode-se adotar, como

alternativa, o método por via úmida, que exige reagentes puros e capela que apresente boa exaustão, pois os vapores e gases liberados do sistema oxidante são altamente tóxicos e corrosivos.

A digestão de matéria orgânica por via úmida com adição de ácidos é de aplicação universal, com exceção de alimentos com alto teor de gorduras, devido ao risco de explosão. No entanto, uma vez que tal digestão é normalmente efetuada com aquecimento em frasco aberto (Béquer ou Erlenmeyer), existem riscos de perdas por projeções de porções da amostra para fora do sistema, o que acarretaria erro analítico.

O objetivo desse trabalho é a proposição de um sistema fechado, simplificado em relação àquele apresentado pelo Analytical Methods Committee⁴, destinado à destruição de matéria orgânica por via úmida viável à maioria dos laboratórios.

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Para testar a eficiência do aparelho desenvolvido, foram utilizados vários tipos de amostras de alimentos recebidas normalmente pelo Instituto Adolfo Lutz para análise bromatológica. Essas amostras foram escolhidas em função das dificuldades apresentadas para a mineralização da matriz orgânica.

Equipamento

O sistema proposto para ser utilizado na destruição da matéria orgânica está esquematizado nas figuras 1 e 2. Trata-se de aparelhagem em vidro, à base de borossilicato, com seis aberturas onde são inseridos balões de Kjeldahl de 100 ml de capacidade e frascos graduados, providos de torneiras, com conexões esmerilhadas, proporcionando a destruição simultânea de matéria orgânica em seis amostras. Em uma das extremidades do sistema fechado está conectado um frasco lavador com água e tendo como segmento uma trompa de vácuo. Isto permite que a operação seja acelerada, além de permitir que os gases liberados no processo sejam dissolvidos na água,

eliminando desta maneira, o uso de uma capela com exaustão. Do lado esquerdo do aparelho há uma válvula de segurança e uma torneira para controlar o vácuo dentro do sistema.

Reagentes

Peridrol (30%) p.a.

Ácido nítrico concentrado p.a.

Solução de peridrol

Preparar uma solução de peridrol, com água desmineralizada, na proporção de 2:1.

Método

Pesar, com precisão de mg, cerca de 2 g da amostra de alimento, previamente triturada e homogeneizada. Transferir quantitativamente para o balão de Kjeldahl, inserindo-o na aparelhagem e iniciar a produção de vácuo com auxílio da trompa de vácuo. Através do funil graduado, situado acima do balão, adicionar 5 ml de ácido nítrico. Iniciar o aquecimento brando do balão por intermédio do bico de Bunsen sob tela de amianto. Sucessivamente, adicionar lentamente novas alíquotas de 5 ml de ácido nítrico e elevar o aquecimento até aproximadamente 350°C na su-

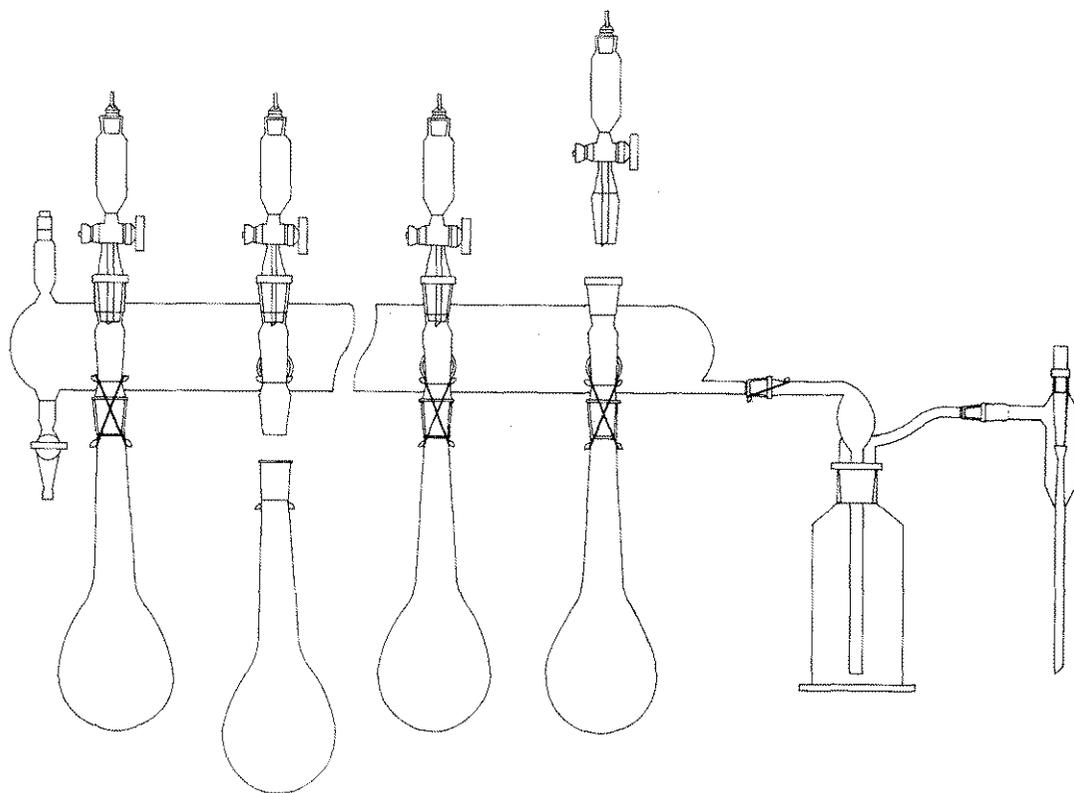


Figura 1 — Sistema digestor para destruição de matéria orgânica. Vista frontal.

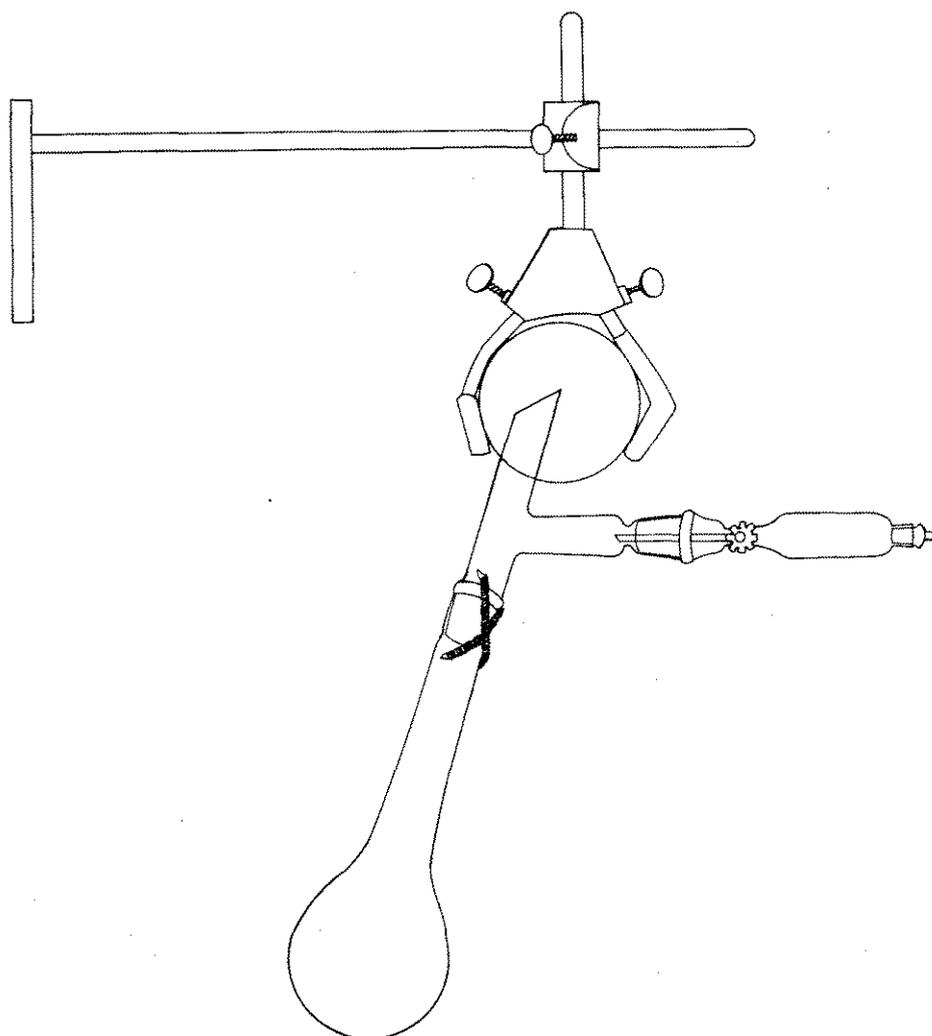


Figura 2 — Sistema digestor para destruição de matéria orgânica. Vista lateral.

perfície do aquecedor. Repetir a operação anterior até que nova adição de ácido nítrico não provoque desprendimento significativo de óxido nítrico. Interromper o aquecimento e adicionar lentamente ao balão de Kjeldahl 5 ml da solução de peridrol. Após alguns minutos, reiniciar o aquecimento e conservá-lo até que o resíduo fique branco ou levemente amarelado. A interrupção do aquecimento visa evitar a ocorrência de reação violenta. As quantidades de reagentes e o tempo de digestão variam com o tipo de alimento.

RESULTADOS

Os volumes de ácido nítrico e o tempo de digestão para a completa mineralização da amostra variaram de acordo com o alimento testado, conforme resultados expressos na tabela 1.

TABELA 1

Volume de HNO₃ e tempo de digestão necessários para mineralização de amostras de alimentos

Amostra	Volume total de HNO ₃ (ml)	Tempo* (min.)
Gelatina	20	90
Leite em pó	20	90
Fígado	15	90
Carne	20	120
Macarrão	20	90
Café	20	90
Arroz	15	90
Feijão	15	100
Cenoura	10	50
Couve	10	50

* Tempo necessário para destruição completa de matéria orgânica e para a evaporação total dos ácidos até a obtenção de um resíduo branco.

DISCUSSÃO

Destes resultados conclui-se que o tempo máximo para destruir a matéria orgânica das amostras de diferentes matrizes foi de 120 minutos, demonstrando eficiência e rapidez na sua mineralização. É bastante adequado para análise de rotina quando se necessita de resultados rápidos e confiáveis.

O método proposto é adequado às determinações de metais pela maioria das técnicas analíticas usualmente empregadas, incluindo os métodos eletroquímicos.

Foi verificado que a eficiência do sistema

proposto depende do vácuo produzido pela trompa, a qual deve ser de vidro e construída de forma conveniente. Máximo vácuo é obtido com alta vazão de água.

É necessário cuidado, por parte do analista, quando se fizerem adições de reagentes ao sistema já aquecido, pois adições rápidas podem provocar o trincamento do balão com a conseqüente perda da amostra.

O tempo para esta operação foi bem inferior ao das outras técnicas utilizadas rotineiramente, tornando-a adequada à maioria dos laboratórios por dispensar o uso de capela de exaustão.

RIALA6/676

SAKUMA, A.M.; OLIVEIRA, J.J.V.; ZENEBON, O.; TIGLEA, P. & SCORSARAVA, M.A. — Digestion system for destruction of organic matter in food analyses. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):179-182, 1989.

ABSTRACT: It is proposed a simple system to destroy organic matter by wet digestion. Several kinds of foods were tested and the results showed that this method is more efficient and faster than the conventional methods used for ashing organic matter in order to evaluate metallic contaminants in foods.

DESCRIPTORS: organic matter, digestion system for its elimination; foods, organic matter destruction; metallic contaminants, determination in foods.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLACK, L.T. — Comparison of three atomic absorption techniques for determining metals in soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 12: 88-91, 1975.
2. KAKULU, S.E.; OSINBAJO, O. & AYAYI, S.O. — Comparison of digestion methods for trace metal determination in fish. *Int. J. Environ. anal. Chem.*, 30(3): 209-17, 1987. *Apud Food Sci. Technol. Abstr.* 20(10), 1988-10R5.
3. MENDEN, E.E.; BROCKMAN, D.; CHOUDHURY, H. & PETERING, H. G. — Dry ashing of animal tissues for atomic absorption spectrometric determination of zinc, copper, cadmium, lead, iron, manganese, magnesium and calcium. *Anal. Chem.*, 49(11): 1644-5, 1977.
4. METHODS for destruction of organic matter — *Analyst*, 85:643-656, 1960.
5. PREER, R.J.; STEPHENS, R.B. & BLAND, C.W. — Sample preparation in determination of lead in garden vegetables by flame atomic absorption spectrophotometry. *J. Assoc. Off. anal. Chem.*, 65(4): 1010-15, 1982.
6. SATZGER, R.D.; BONNIN, E. & FRICKE, F.L. — Development of a quality assurance program for determination of ultratrace background levels of lead and anodic stripping voltametry. *J. Assoc. Off. anal. Chem.*, 67(6): 1138-40, 1984.
7. SERRA, T.M. & SERRANO, J.F.V. — Influence of phosphorus and calcium on flame atomic absorption spectrophotometric determination of lead in canned fish products. *J. Assoc. Off. anal. Chem.*, 67(1): 186-7, 1984.
8. THE USE of 50 per cent hydrogen peroxide for the destruction of organic matter — *Analyst*, 92: 403-7, 1967.
9. THE USE of 50 per cent hydrogen peroxide for the destruction of organic matter — *Analyst*, 101: 62-6, 1976.
10. THORNBURG, W. — Precautions in ashing techniques for lead determination in food. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 65(4): 992-3, 1982.

Recebido para publicação em 23 de maio de 1989.

DETERMINAÇÃO DAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS
ESTRUTURAIS E QUÍMICAS DA DROGA *ANEMOPAEGMA*
(VELL) STELLFELD (CATUABA)

Luzia Ilza Ferreira JORGE**
Vicente de Oliveira FERRO***
Alice M. SAKUMA**

RIALA6/677

JORGE, L.I.F.; FERRO, V.O. & SAKUMA, A.M - Determinação das principais características estruturais e químicas da droga *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellfeld (catuaba). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):183-191, 1989.

RESUMO: *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellfeld é caracterizada sob a apresentação de droga vegetal, destacando-se seus elementos histológicos mais característicos, fraudes que ocorrem na comercialização, elementos minerais de importância bromatológica, triagem de princípios ativos e caracterização físico-química do extrato-fluido.

DESCRIPTORIOS: *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellfeld, catuaba, *Anemopaegma sp.*

INTRODUÇÃO

As barreiras geográficas impostas pelas dimensões do nosso país geram o fenômeno da atribuição de um mesmo nome popular a vegetais, sequer aparentados do ponto de vista botânico. E, por ser tão freqüente, não podemos ignorar este fato; ao contrário, devemos estudá-lo, esclarecê-lo e apresentar dados que propiciem o seu julgamento.

No caso da catuaba, observamos que três espécies predominam no comércio e nas referências populares^{1,4,5,6,8,9,15,19,23,24}.

- *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellfeld - Bigoniácea
- *Erythroxylum catuaba* A.J da Silva - Eritroxilácea
- *Trichilia sp* - Meliácea

Contudo, somente a primeira é considerada droga oficial, estando inscrita na 1ª edição da Farmacopéia Brasileira²⁰.

A ação muscarínica dos extratos aquosos de *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellfeld foi primei-

ramente observada por HAMET^{10,11} e por CLERC et alii² em 1937 que, trabalhando isolada, porém simultaneamente, confirmaram a existência de efeito hipotensor e efeito bradicardizante em cobaias e em cães submetidos à ação da droga.

Mais recentemente, MARKUS et alii¹³ observaram efeitos bifásicos, isto é, efeitos parassimpatomiméticos, que foram revertidos, observando-se efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos, que foram bloqueados por propranolol, ou não ocorreram em animais reserpinizados.

Os estudos químicos cessaram desde 1911, quando PECKOLT¹⁵ encontrou ácidos resinosos, substância amarga, matéria gordurosa etc.

HYAKUTAKE & GROTTA¹², MORRETES¹⁴ e SILVA^{20,21} estudaram a anatomia do vegetal através de cortes histológicos.

O objetivo deste trabalho é destacar características anatômicas e químicas que permitam a identificação da espécie apresentada sob a forma de droga, isto é, pulverizada, triturada ou como extrato-fluido²⁰.

* Realizado na Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Departamento de Farmácia. FCF. USP, São Paulo, SP.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Anemopaegma arvense (Vell) Stefffeld, coletada no Estado de Mato Grosso, foi identificada por confrontação com exsitas existentes no Instituto de Botânica de São Paulo. Esse material foi dividido em partes aéreas e subterrâneas e, após moagem, foi utilizado para o estudo proposto.

Características físico-químicas

Os exames das características físico-químicas efetuados no extrato-fluido da planta foram: densidade (medida com picnômetro), teor alcoólico (medido com alcoômetro), índice de refração* (medido com refratômetro) e porcentagem de cinzas.

Os extratos-fluidos das partes aéreas e subterrâneas foram obtidos pelo processo A, descrito na Farmacopéia Brasileira, 1ª edição²⁰.

Análise Mineral

A composição mineral da amostra analisada foi determinada empregando-se técnicas instrumental e volumétrica.

Preparação da amostra — pesar com exatidão cerca de 10 g da amostra, previamente pulverizada e homogeneizada, em cápsula de porcelana. Incinerar cuidadosamente em bico de Bunsen até completa carborização e, em seguida, levar à mufla a 400°C até que as cinzas fiquem brancas ou levemente amareladas. Esfriar, dissolver com 5 ml de ácido nítrico concentrado p.a. e aquecer em chapa elétrica para eliminar o excesso de ácido. Transferir quantitativamente, com auxílio de água, para um balão volumétrico de 50 ml e completar o volume. Filtrar e analisar os minerais no filtrado.

MÉTODOS

Os métodos empregados para determinação de cálcio, ferro, fósforo e potássio encontram-se descritos nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁵. Para a determinação de magnésio, foi utilizado o mesmo método para o cálcio, porém a solução amostra foi previamente neutralizada com hidróxido de sódio até pH ¹⁰.

Determinação do manganês

Reagentes

Solução-padrão estoque de manganês, 1.000

mg/l, preparada a partir de solução titrisol Merck.

Soluções-padrão de trabalho de manganês, 0,2 mg/l, 0,5 mg/l e 1,0 mg/l, preparadas a partir da solução-padrão estoque.

Equipamento

Espectrofotômetro de absorção atômica, mod. 460, Perkin Elmer, equipado com corretor de deutério.

Condições experimentais — chama ar/acetileno, fenda 0,2 nm e comprimento de onda 279,5 nm.

Procedimento — diluir a solução amostra 50 ou 100 vezes, em função da concentração de manganês presente e efetuar a leitura no espectrofotômetro de absorção atômica. Fazer as leituras das soluções-padrão de manganês e do branco.

Análise fitoquímica

A triagem fitoquímica foi procedida por DOMINGUES¹. As estruturas anatômicas foram estudadas com o emprego de microscopia ótica e de corantes histoquímicos.

RESULTADOS

Estudo anatômico das partes aéreas

As paredes das células epidérmicas (epiderme superior e epiderme inferior) são fortemente espessadas (xeromorfismo) e coram-se intensamente pela hematoxilina de Delafield. Ambas as epidermes apresentam paredes anticliniais retas ou ligeiramente curvas (xeromorfismo) e cutícula estriada (xeroformismo).

Confirmamos a ocorrência de estômatos e tricomas totores na epiderme inferior. Na epiderme superior há tricomas glandulares conforme já observado por diversos anatomistas^{12,14,20,21}.

Os tricomas totores são pluricelulares, têm o ápice afilado e recurvado, paredes espessas, cutícula parcial ou inteiramente rugosa, podendo também ocorrer lisa (figura 1). Esse tricoma é mais facilmente observado em folhas jovens.

Na epiderme superior são encontrados cristais esféricos de formatos bizarros, bem como pequenos cristais prismáticos. Ambos os tipos de cristais ocorrem em pequena quantidade.

Também são observadas nas partes aéreas da droga: fibras celulósicas pontoadas, grãos de

* Warszwua, mod. RL 2-NR 1753.

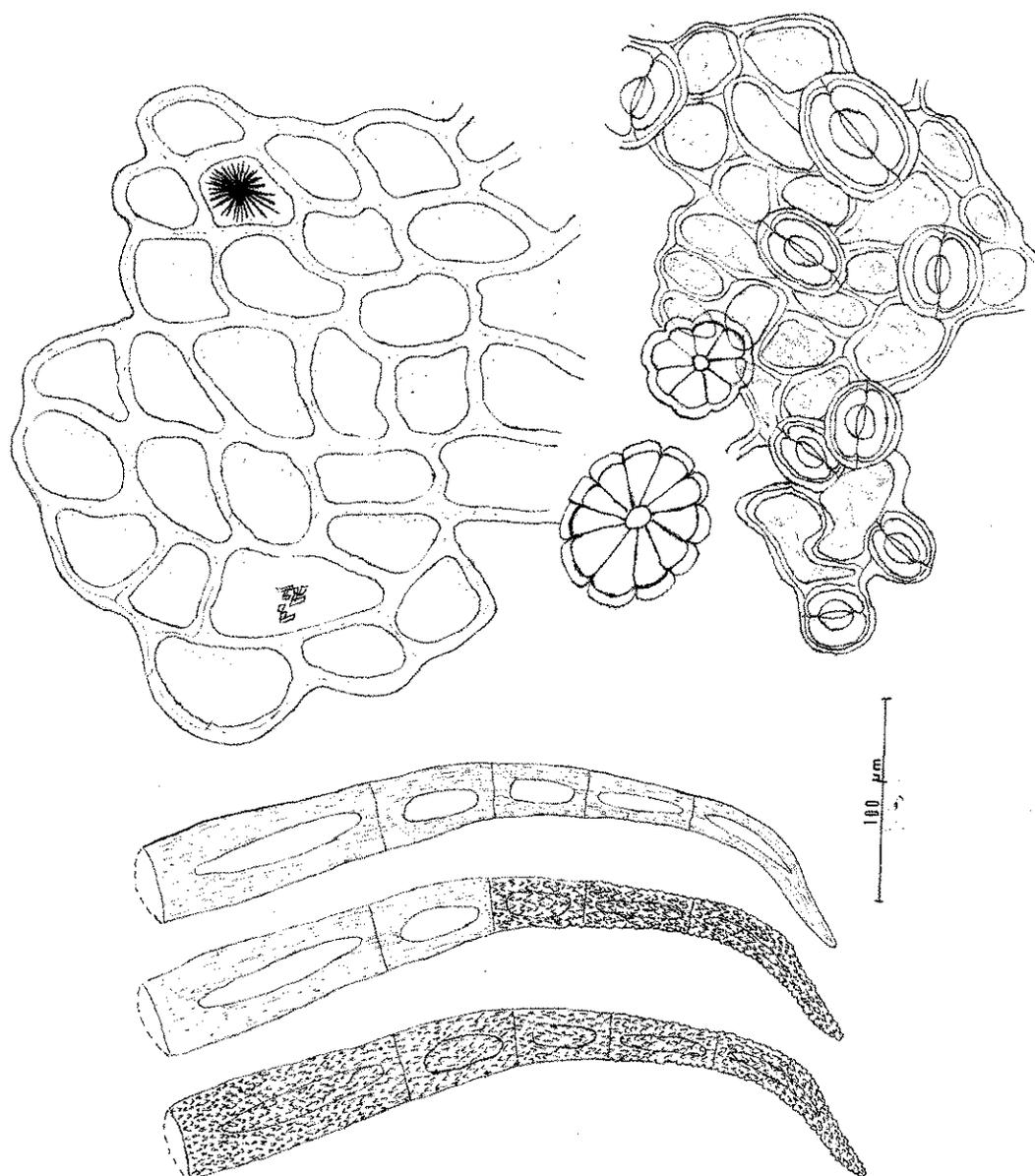


FIGURA 1 — *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellfeld - partes aéreas:
A - epiderme superior
B - epiderme inferior
C - tricoma glandular
D - tricoma tector.

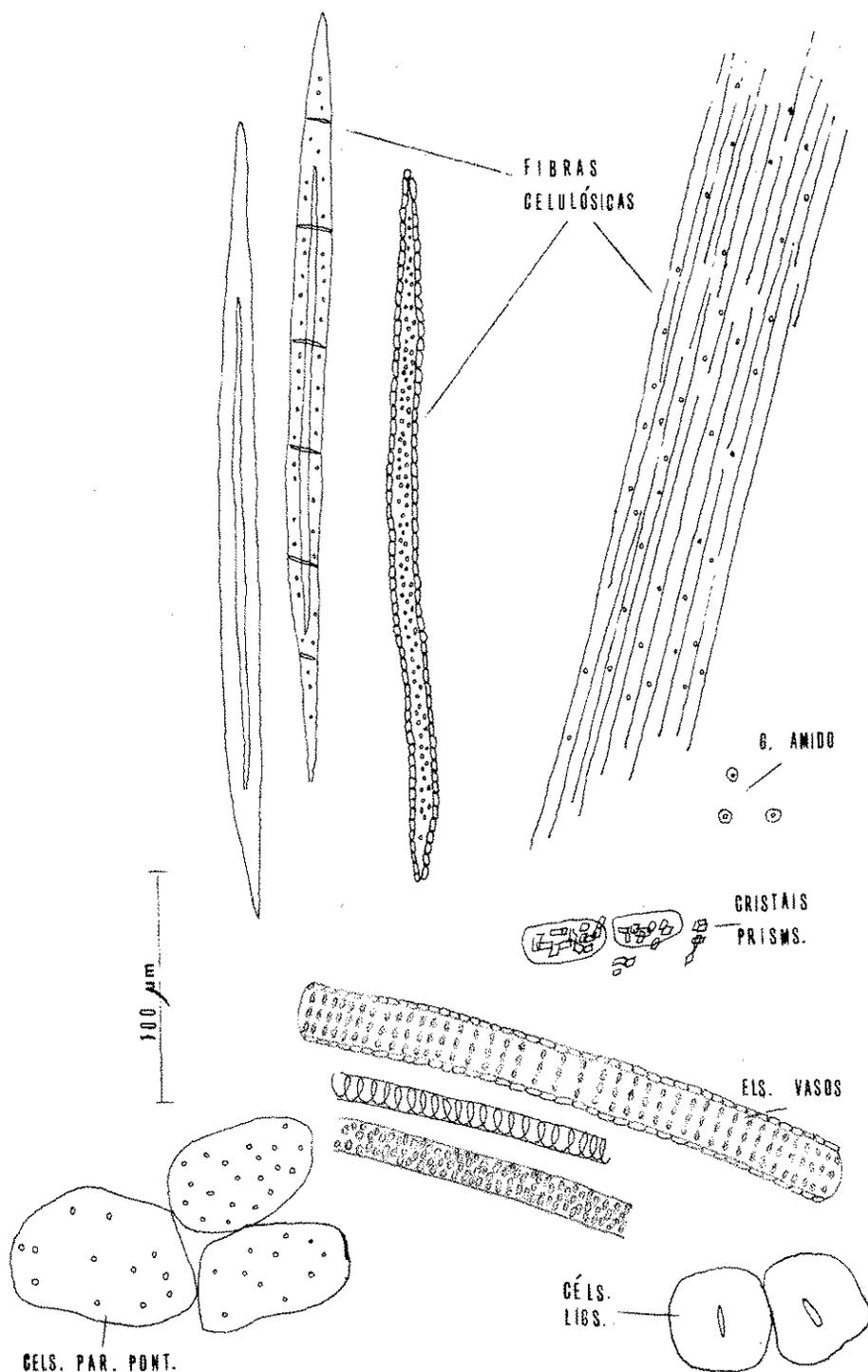


FIGURA 2 — *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellfeld - partes aéreas:
 Fibras celulósicas
 Grãos de amido e cristais prismáticos
 Céls. par. pont. - células parenquimáticas com pontuações
 Els. vasos - elementos de vasos com pontuações transversais
 Céls. lig. - células lignificadas do súber

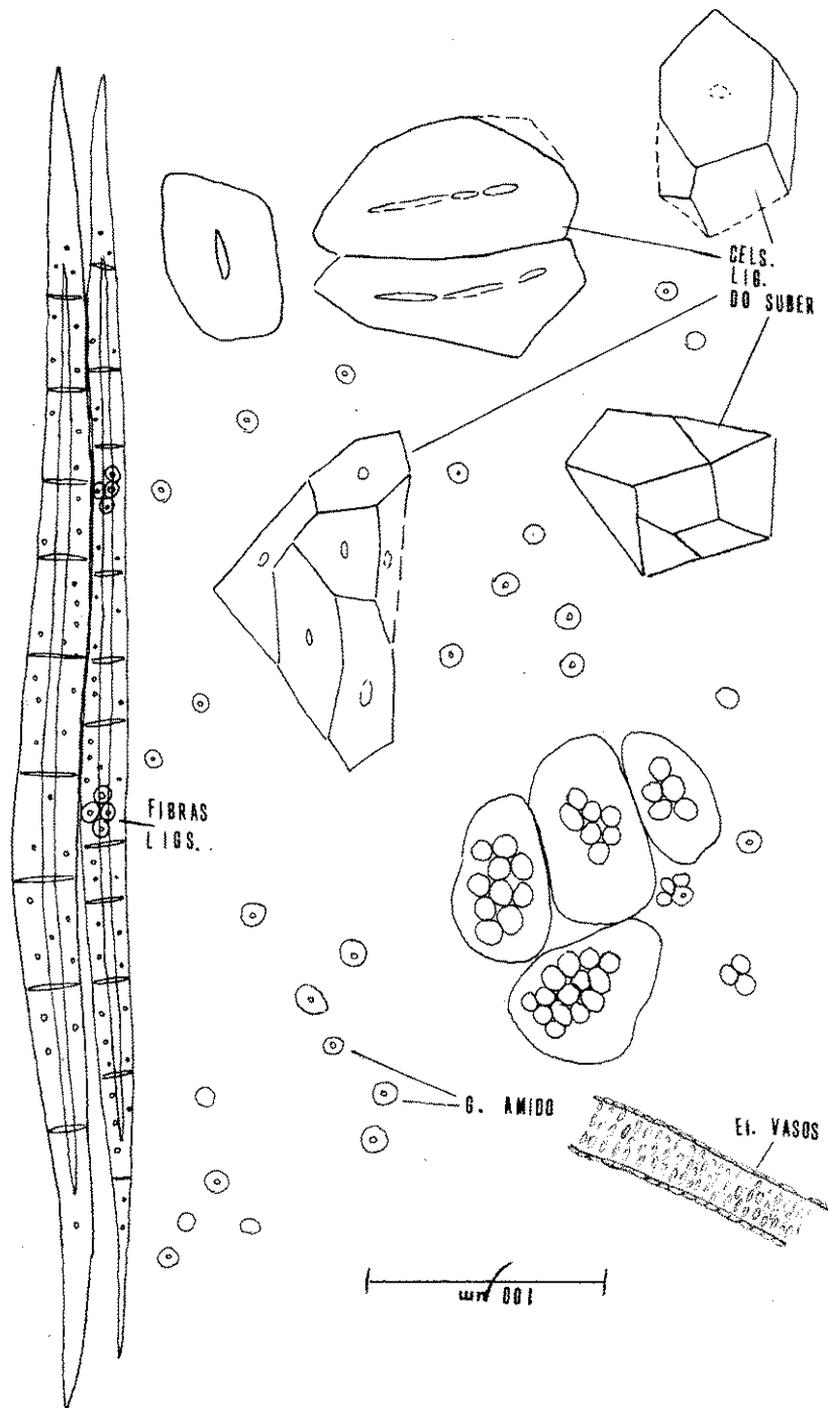


FIGURA 3 — *Anemopaegma arvense* (Vell) Steilfeld - partes subterrâneas:
Fibras lig. - fibras lignificadas
Céls. lig. do súber - células lignificadas do súber
Grãos de amido
Els. vasos - elementos de vasos

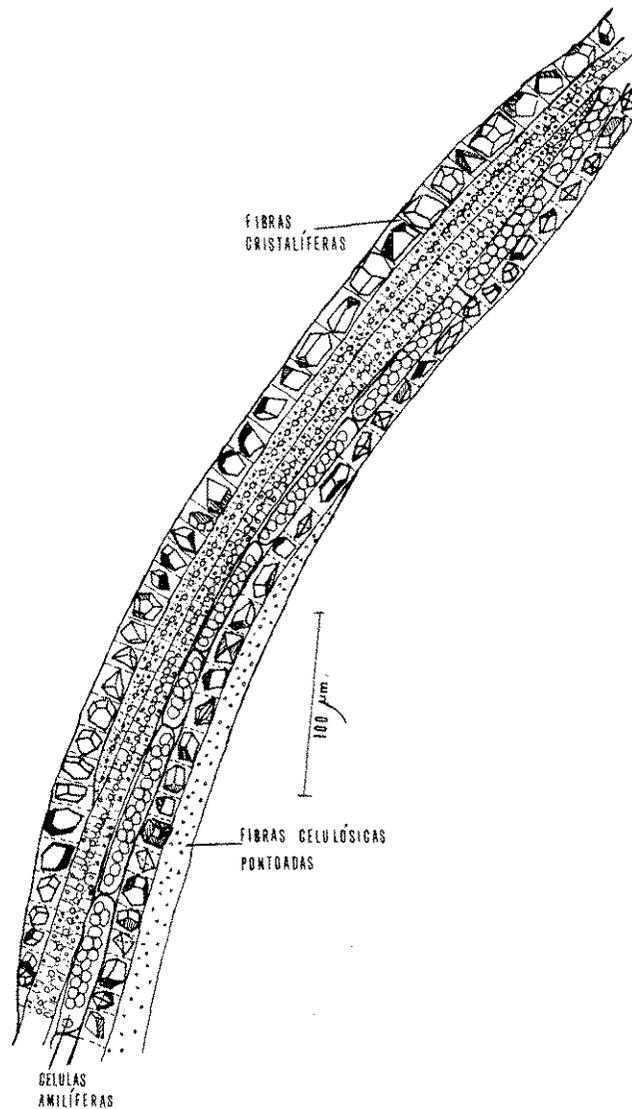


FIGURA 4 — Fibras da eritroxylácea comercializada como catuaba: fibras celulósicas com pontuações e células amilíferas

amido de formato circular e diâmetro de cerca de 8 μ m, e fibras amilíferas. As fibras pontoadas destacam-se dos vasos pontoados por serem mais delgadas, mais longas, e possuírem terminação em bisel (figura 2). Nas partes aéreas há maior quantidade de fibras celulósicas do que de fibras lignificadas.

Estudo anatômico das partes subterrâneas

Nas partes subterrâneas, trituradas e descoradas com solução de hipoclorito de sódio a 5%, observa-se grande quantidade de grãos de amido, fibras lignificadas e células lignificadas procedentes do súber.

Grãos de amido ocorrem em grande quantidade, isolados, agrupados ou contidos em fibras, constituindo fibras amilíferas. Ao seccionarmos porções do caule e da raiz do vegetal, verificamos que esse amido localiza-se tanto na região do parênquima medular como na região do parênquima xilemático (células, raios vasculares e fibras xilemáticas).

Células com lignificação muito peculiar, procedentes do súber (o que se diagnostica através de cortes), ocorrem nas partes subterrâneas da planta. Essas células ocorrem isoladas ou agregadas quando estudamos a droga fortemente triturada. Suas paredes são delgadas, porém seu protoplas-

ma é impregnado de lignina, corando-se intensamente pela floroglucina clorídrica. O formato e as dimensões dessas células, bem como a delgadeza das suas paredes, fazem com que se assemelhem às células parenquimáticas. Somente o emprego de corante, essencial para essa diagnose, permite o reconhecimento dessas células.

Estudo anatômico no reconhecimento de fraude mais freqüente

Erythroxylum sp., oriundo da região Norte do país, é o vegetal mais comumente encontrado sob a denominação de catuaba, em substituição à espécie oficial, em São Paulo.

Essa eritroxilácea é apresentada comercialmente como fragmentos fortemente avermelhados de cascas caulinares. O exame microscópico ou o exame macroscópico (visual), indiferentemente, permitem, rápida e facilmente, a distinção com referência aos fragmentos de *Anemopaegma arvense* (Vell) Stelfeld. Após triturar, descorar e montar esses fragmentos caulinares entre lâmina e lamínula, sobressaem-se no campo microscópico as fibras densa e caracteristicamente grupadas, dispostas seqüencialmente: fibras celulósicas, fibras cristalíferas, e células parenquimáticas de formato alongado, intercaladas e contendo grãos de amido (figura 4). Esses elementos histológicos são muito peculiares, caracterizando assim a eritroxilácea do ponto de vista estrutural.

Estudo químico

Os níveis dos teores dos minerais analisados estão listados na tabela 1.

TABELA 1

Níveis de minerais encontrados em Anemopaegma arvense (Vell) Stelfeld (calculados na base seca)

Minerais	P. aéreas* (mg/100g)	P. subterrâneas* (mg/100g)
Magnésio	497	171
Potássio	464	253
Cálcio	262	212
Fosfato	36	29
Manganês	31	15
Ferro	10	12

* Valor médio de duplicatas.

A triagem fitoquímica dos princípios ativos naturais, procedida segundo DOMINGUES¹, em amostras de 2 a 3 g do pó da droga, revelou idênticos resultados para as partes aéreas e subterrâneas. Esses resultados encontram-se expressos na tabela 2.

TABELA 2

Triagem fitoquímica dos princípios encontrados em Anemopaegma arvense (Vell) Stelfeld

Princípios ativos	Resultados
Alcalóides	Testes negativos
Antraderivados	Testes negativos
Compostos fenólicos (taninos)	Testes positivos
Saponinas	Testes positivos
Flavonóides	Testes duvidosos
Cumarinas	Teste positivo
Quinonas	Teste positivo
Nucleo esteróide	Teste positivo
Lactonas pentagonais	Testes positivos
2-desoxiaçúcares	Teste positivo

TABELA 3

Características físico-químicas dos fluidos de Anemopaegma arvense (Vell) Stelfeld

Determinações	P. aéreas*	P. subterrâneas*
Resíduo seco (% p/p)	16,5	9,9
Densidade (25°C) (% p/p)	0,9768	0,9652
Cinzas totais (% p/p)	0,85	0,65
Cinzas insolúveis em ácido clorídrico (% p/p)	0,23	0,123
Teor alcoólico (20°C)	35°GL	32° GL
pH	5,6	5,8
Índice de refração (24°C)	1,384	0,371

* Valor médio de duplicatas.

Com os extratos-fluidos obtidos foram realizados testes de caracterização físico-química, cujos resultados, médias de duplicatas, encontram-se expressos na tabela 3.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

HYAKUTAKE & GROTTA¹², MORRETES¹⁴ e SILVA^{20,21} estudaram a anatomia do vegetal através de cortes histológicos. Com isso, prestaram importante serviço quanto à elucidação da estrutura anatômica, arranjo e relação entre os diferentes tecidos dessa espécie. Contudo, após secagem e pulverização, os elementos histológicos do vegetal se destacam, revelando novos detalhes, alterando o aspecto de estruturas mais frágeis, etc. Portanto, apesar de ter tido sua anatomia estudada por três eminentes anatomistas, certas características histológicas foram originalmente observadas por nós: freqüência relativa, formato e dimensões dos grãos de amido; detalhes de formato e de cutícula dos tricomas tectores; formato, dimensões relativas e peculiaridades das paredes e do protoplasma das células do

súber, presença de fibras amilíferas, frequência e tipos de impregnação ocorridos nas fibras, reconhecimento de adulterações.

MORRETES¹⁴ observou a presença de um rebordo junto à fenda estomática. Também descreveu em detalhe a organização do tricoma glandular. MORRETES¹⁴ ainda contestou HYAKUTAKE & GROTTA¹², empregando a denominação genérica de esclerênquima para grupos de fibras que aparecem envolvendo os feixes vasculares da nervura central, que estes chamam de periciclo multisseriado fibroso descontínuo. Concordamos com a diagnose de MORRETES¹⁴.

HYAKUTAKE & GROTTA¹² descrevem a estrutura anatômica secundária da raiz, em que se destacam cunhas de floema que se dispõem em continuidade com outro floema de localização externa, ambos envolvidos por abundante parênquima e grupos de fibras em séries concêntricas. Os autores relatam ainda que foi encontrada pouca quantidade de grãos de amido neste órgão, com o que não concordamos.

A presença de tricomas tectores apenas na epiderme inferior pode ser racionalizada como sendo este um elemento de proteção contra a perda de água por transpiração estomática, problema

muito freqüente no cerrado.

Grãos de amido são mais abundantes nas partes subterrâneas do que nas partes aéreas. O formato e dimensões desses grãos de amido são muito característicos e lembram o amido de uma esterculiácea de grande importância bromatológica, *Theobroma cacao* (cacau).

Apesar de ser planta de cerrado, portanto de solo pobre, podem-se considerar de importância os teores de cálcio, magnésio e potássio encontrados.

Pela triagem fitoquímica, podemos inferir a presença de compostos fenólicos, esteróides, saponinas e, talvez, também flavonóides.

A caracterização do extrato-fluido dá-se através dos seus parâmetros físico-químicos, uma vez que não são encontrados elementos histológicos nessa forma farmacêutica, devido ao processo de filtração a que é submetida.

Agradecimento

Agradecemos ao Prof. Fernando de Oliveira, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela colaboração prestada em diversas etapas deste trabalho.

RIALA6/677

JORGE, L.I.F.; FERRO, V.O. & SAKUMA, A.M. - Determination of main chemical and structural characteristics of the drug *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellfeld (catuaba). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):183-191, 1989.

ABSTRACT: *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellfeld (catuaba) is defined as a vegetal drug form, detaching the more characteristics histological elements, frauds, concentration of mineral elements of bromatological importance, identification of natural active components and chemical-physical characterization of the fluid-extract.

DESCRIPTORS: *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellfeld, catuaba, *Anemopaegma* sp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRAGA, R. - *Pantas do Nordeste*. 2ª ed. Fortaleza, Imprensa Oficial, 1960. p.180-1.
2. CLERC, A; JANOT, M.M. & PARIS, R. - Sur l'action physiologique du catuaba. *Comp. rendus soc. biol.*, 125:430-1, 1937.
3. COIMBRA, R. - *Notas de Fitoterapia*, Rio de Janeiro, L.C.S.A. 1942. p. 75.
4. CORREIA, M.P. - *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1931, v.2. p. 152.
5. CRUZ, G.L. - *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Editora Civilização Brasileira, 1982. p. 181.
6. CUNHA, N.S. - A questão da origem botânica da catuaba. *Trib. farm.* 7(3): 45-52, 1939.
7. DOMINGUES, X.A. - *Métodos de investigación fitoquímica*. México, Editorial Limusa, 1973. 281p.
8. DUCKE, A. - A catuaba na botânica sistemática científica e pseudo-científica. *Rev. bras. Farm.*, 47: 267-1, 1966.
9. FERRI, M.G. - *Plantas do Brasil, espécies do cerrado*. São Paulo, Edgard Blücher, 1969. p-34.7.
10. HAMET, R. - Sur quelques effets physiologiques de

- la drogue brésilienne connue sous le nom de "folhas de catuaba". *Comp. rendus Soc. Biol.*, 124:904-7, 1937.
11. HAMET, R. & MERCIER, L.J. - Sur l'action physiologique du catuaba et de la catuabine. *Comp. rendus Séanc. Soc. Biol.*, 55: 1077-9, 1931.
 12. HYAKUTAKE, S & GROTTA, S. - Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de *Anemopaegma arvense* (Vell) Stefffeld. var. *petiolata* Bur. Bignoniaceae. *Rev. Fac. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 3(1):51-78, jan./jun., 1965.
 13. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo) - *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3ª ed. São Paulo, IMESP, 1985, v.1. p. 34-41.
 14. MARKUS, R.P.; GONÇALO, M.C.; LAPA, A.J.; SOUZA, L.C.B. & VALLE, J.R. - Atividade farmacológica dos extratos de catuaba, *Anemopaegma arvense* (Vell) Stefffeld. *Cienc. Cult.*, 33 (Supl.): 130-5, 1980.
 15. MORRETES, B.L. - *Contribuição ao conhecimento da anatomia ecológica de plantas do cerrado de EMAS-SP e da caatinga amazônica do Km 62 da rodovia BR 174*. São Paulo, Instituto de Biociências USP, 1980. [Tese de livre-docência]
 16. PECKOLT, T. - Catuaba. Heil und nutz pflanzen brasiliene. Bignoniaceae. *Ber. dt pharm. Ges.*, 21: 346-363. 1911.
 17. PENNA, M. - *Dicionário de plantas medicinais*. Rio de Janeiro, Livraria Kosmos, 1946. p. 96.
 18. RIZZINI, C.T. - Catuaba. *Rodriguésia*. 18/19 (30/31): 4-6, 1956.
 19. RIZZINI, C.T. & MORS, W.B. - *Botânica brasileira*. São Paulo, EDUSP, 1976. P. 84.
 20. SILVA, R.A.D. - Catuaba. *Rev. bras. Med. Farm.* 3 (1/2): 55-62, 1929.
 21. SILVA, R.A.D. - *Farmacopéia brasileira*. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1929. p. 194 e 385.
 22. STELLFELD, C. - As drogas vegetais da Farmacopéia brasileira em face do sistema taxonômico. *Trib. farm.*, 8 (5): 115-7, 1940.
 23. STELLFELD, C. - Ioimbina e catuaba. *Trib. farm.*, 30(5/6): 35-7, 1962.
 24. VAZ, L. - Catuaba. *Rev. clin. farm.*, 3 (18): 35-6, 1936. niaceae. *Rev. Fac. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 3 (1): 51-78, jan./jun., 1965.

Recebido para publicação em 31 de maio de 1989.

SOROTIPOS E PIOCINOTIPOS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

Tânia Mara Ibelli VAZ**
Kinue IRINO**
Iika Maria LANDGRAF**
Maria Cristina de Cunto BRANDILEONE**
Vera Simonsen Dias VIEIRA**

RIALA6/678

VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; LANDGRAF, I.M.; BRANDILEONE, M.C.C. & VIEIRA, V.S.D. — Sorotipos e piocinotipos de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 49(2):193-198, 1989.

RESUMO: 195 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, a maioria isoladas de sangue e de líquido cefalorraquidiano foram sorotipadas de acordo com o método de aglutinação em lâmina. Os sorotipos 0:6 e 0:11 foram os tipos prevalentes com 25,64% e 20,54%, respectivamente. O sorotipo 0:10 causou um surto de meningite envolvendo principalmente crianças com menos de um ano de idade, em 1974, na vigência da epidemia de meningite meningocócica na cidade de São Paulo. Dentre os sorotipos foram encontrados 12 diferentes piocinotipos com predominância dos tipos 1,3 e 10 que correspondem a cerca de 90% das cepas tipadas. É importante o uso combinado dos métodos de sorotipagem e piocinotipia para diferenciação de cepas pertencentes a um mesmo sorotipo.

DESCRITORES: *Pseudomonas aeruginosa*, sorotipos, piocinotipos.

INTRODUÇÃO

A *Pseudomonas aeruginosa* representa um dos mais importantes agentes de infecções nosocomiais causadas por bacilos Gram negativos^{6, 15, 22}.

Infecções em pacientes hospitalizados, por estes patógenos oportunistas, têm atingido especialmente imunodeprimidos, queimados e recém-nascidos prematuros. Estes microrganismos estão também frequentemente associados à fibrose cística^{2, 14, 20, 24}.

A multirresistência antibacteriana, freqüente entre as cepas de *P. aeruginosa*, tem representado um grande problema terapêutico, principalmente para os pacientes de risco onde as infecções têm geralmente graves conseqüências como a meningite, pneumonia e bacteriemia com taxas significantes de mortalidade^{4,7}.

Os alimentos, principalmente os vegetais, a

água de nebulizadores, flores e mesmo desinfetantes têm sido incriminados como os mais comuns reservatórios de *P. aeruginosa* no meio ambiente hospitalar^{16, 21, 29}.

Estudos epidemiológicos de infecções hospitalares por *P. aeruginosa* foram realizados em vários países, utilizando diferentes marcadores tais como sorotipos, piocinotipos, padrões de resistência aos antibacterianos e fagotipos.

Relatos sobre ocorrência de infecções sistêmicas por *P. aeruginosa* têm sido freqüentes em nosso meio; entretanto, somente a caracterização de cepas através de seus diferentes marcadores permite o estudo da epidemiologia desta infecção.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar as cepas de *P. aeruginosa* de origem hospitalar, isoladas no período de 1974 a 1987, através de métodos de sorotipagem e piocinotipia, e verificar

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

a possível correlação existente entre estes dois sistemas de marcadores epidemiológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas Bacterianas

Foram estudadas 195 cepas de *P. aeruginosa*, sendo 88 isoladas de líquido cefalorraquidiano, 84 de sangue e 23 de outros materiais como de secreção pulmonar, ponta de cateter, secreção de orofaringe, abscesso, secreção do ouvido, urina e secreção ocular. A caracterização da espécie foi realizada baseando-se nas características bioquímicas apresentadas no "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"²³.

Método de identificação sorológica

Preparo de antissoro — Os antissoros foram preparados utilizando-se as cepas-padrão de *P. aeruginosa* recebidas do Departamento de Saúde do Estado de Nova York, Estados Unidos. Para o preparo dos antígenos, as cepas-padrões foram cultivadas em ágar tripton de soja por 18-20 horas, a 30°C em estufa. O crescimento bacteriano, ressuspenso em solução fisiológica, foi aquecido a 100°C, por 2 horas e 30 minutos e, a seguir, lavado 3 vezes com solução fisiológica estéril. Os antígenos, contendo aproximadamente 5×10^{10} bactérias por ml, foram inoculados por via endovenosa, em coelhos albinos com peso

superior a 2,5 kg. O esquema de imunização foi iniciado com 0,25 ml, seguido de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 ml, com intervalo de 4 dias entre as inoculações¹⁷. A sangria dos coelhos foi feita 3 a 4 dias após a última inoculação. Os soros, após adição de mertiolate a 1/10.000, foram conservados a + 4°C. A titulação foi feita em lâmina e as reações cruzadas foram eliminadas através de absorção. Dos 17 soros somáticos específicos obtidos foram preparados quatro soros polivalentes com as seguintes constituições.

Soro polivalente A: 0:1 + 0:3 + 0:7 + 0:8
 Soro polivalente B: 0:2 + 0:5 + 0:9 + 0:16
 Soro polivalente C: 0:4 + 0:6 = 0:10 + 0:13 + 0:14
 Soro polivalente D: 0:11 + 0:12 + 0:15 + 0:17

Identificação sorológica — As cepas foram cultivadas em ágar comum por 18-24 horas a 30°C, em estufa. Suspensões bacterianas densas, em solução fisiológica, foram testadas em lâmina, inicialmente com os soros polivalentes e, a seguir, com os monovalentes.

Método de piocinotipia segundo FYFE et alii¹⁰

As cepas-padrões indicadoras foram recebidas do Departamento de Bacteriologia da Universidade de Edinburg, Escócia, Grã-Bretanha.

As cepas a serem testadas foram isoladas em

TABELA 1

Distribuição dos sorotipos de *P. Aeruginosa* segundo os materiais

Sorotipo	Cepas		Material					
	Total		Sangue		LCR		Outros	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
01	17	8,72	10	11,91	5	5,68	2	8,69
02	14	7,18	4	4,76	8	9,09	2	6,69
03	5	2,56	3	3,57	1	1,14	1	4,35
04	7	3,59	2	2,38	6	6,82	0	0,00
05	15	7,70	6	7,14	7	7,95	2	8,69
06	50	25,64	31	36,91	12	13,63	-	30,44
07,8	5	2,56	2	2,38	3	3,41	0	0,00
09	2	1,03	1	1,19	1	1,14	0	0,00
010	19	9,74	2	2,38	17	19,32	0	0,00
011	40	20,51	13	15,48	19	21,59	7	30,44
016	13	6,67	9	10,71	3	3,41	1	4,35
NI	8	4,10	1	1,19	6	6,82	1	4,35
Total	195	100,0	84	100,00	88	100,00	23	100,00

LCR = Líquido cefalorraquidiano.

ágar Columbia (Oxoid) e incubadas por 18 horas, a 37°C. Para cada cepa, 1 colônia isolada em placa foi suspensa em 1 ml de solução fisiológica, de maneira a conter 10⁸—10⁹ bactérias/ml; oito placas de Petri contendo 10 ml de ágar triptona de soja foram inoculadas em forma de *spot* com 1 ml de cada suspensão. Após um período de incubação de 6 horas, a 30°C, o crescimento bacteriano foi inativado pela exposição ao clorofórmio por 15 minutos. A produção de piocinas foi verificada pela inibição das cepas indicadoras semeadas sobre os *spots*. Cada cepa indicadora foi cultivada em 2 ml de caldo comum, sem agitação, durante 4 horas e, a seguir, 0,1 ml de cada cultura foi misturada a 2,5 ml de ágar semi-sólido contendo 1% de peptona e 0,5% de ágar. Cada inóculo que continha uma das 8 cepas indicadoras foi vertido sobre a placa contendo os *spots* das cepas em estudo. A determinação dos piocinotipos foi baseada no perfil de inibição das 8 cepas indicadoras.

11 sorotipos, sendo 0:6 e 0:11 os mais freqüentemente encontrados com 25,64% e 20,54%, respectivamente (tabela 1).

Através do método de piocinotipia 89,76% das cepas puderam ser tipadas; foram encontrados em grandes proporções os piocinotipos 1, 3 e 10, perfazendo cerca de 90% das cepas tipadas; 5,13% foram produtoras de piocinas, porém não classificáveis e 5,13% não produziram piocinas (tabela 2).

As associações entre sorotipos e piocinotipos estão demonstradas na tabela 3. Verifica-se 100% de associação entre os sorotipos 0:11 e piocinotipo 10, sorotipo 0:5 e piocinotipo 1 e sorotipo 0:10 e piocinotipo 1; 92,9% dos sorotipos 0:16 são piocinotipo 1; 87,5% dos sorotipos 0:4 são piocinotipo 10; 80% dos sorotipos 0:7 são piocinotipo 1; 60% dos sorotipos 0:6 são piocinotipo 3 e 60% de 0:3 são piocinotipo 5.

RESULTADOS

A aplicação dos métodos de sorotipagem e piocinotipia foram considerados isoladamente, e também associados como partes de um sistema combinado de tipagem.

Das 195 cepas, 95,9% foram classificadas em

DISCUSSÃO

Entre os bacilos Gram-negativos envolvidos em infecções nosocomiais, *P. aeruginosa* tem se destacado como um dos responsáveis pela ocorrência destas infecções.

Nos estudos epidemiológicos, a utilização de marcadores tem contribuído na detecção de fontes

TABELA 2

Distribuição dos piocinotipos de P. aeruginosa segundo material

Piocinotipo	Cepas		Material					
	Total		Sangue		LCR		Outros	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	74	37,95	26	30,95	42	47,73	6	26,08
3	34	17,44	19	22,62	9	10,23	6	26,08
5	3	1,54	2	2,38	-	-	1	4,35
6	6	3,08	3	3,57	2	2,27	1	4,35
10	48	24,62	16	19,05	25	28,40	7	20,44
22	1	0,51	-	-	1	1,14	-	-
23	1	0,51	-	-	1	1,14	-	-
33	3	1,54	1	1,19	1	1,14	1	4,35
35	1	0,51	1	1,19	-	-	-	-
45	2	1,02	2	2,38	-	-	-	-
50	1	0,51	1	1,19	-	-	-	-
76	1	0,51	1	1,19	-	-	-	-
NC	10	5,13	5	5,95	4	4,55	1	4,35
NP	10	5,13	7	8,34	3	3,14	-	-
Total	195	100,00	84	100,00	88	100,00	23	100,00

NC = Não classificados.

NP = Não produtoras.

TABELA 3

Associação entre sorotipos e piocinotipos de *P. aeruginosa*

Cepas		Tipos de Associação				
Sorotipo	Nº	Sorotipos/piocinotipos	Nº	%		
01	17	01/NP	9	52,94		
		01/NT	5	29,41		
		01/P.22	1	5,88		
02	14	01/P.33	2	11,77		
		02/P.1	13	92,86		
		02/P.3	1	7,14		
03	5	03/P.5	3	60,00		
		03/P.35	1	20,00		
04	8	03/P.23	1	20,00		
		04/P.10	7	87,50		
05	15	04/P.1	1	12,50		
		05/P.1	15	100,00		
06	50	06/P.3	30	60,00		
		06/P.6	6	12,00		
		06/NT	5	10,00		
		06/P.1	4	8,00		
		06/P.45	2	4,00		
		06/P.76	1	2,00		
		06/P.33	1	2,00		
		06/P.50	1	2,00		
		07,8	5	07,8/P.1	4	80,00
				07,8/P.10	1	20,00
		09	2	09/P.1	2	100,00
		010	19	010/P.1	19	100,00
		011	39	011/P.10	39	100,00
016	13	016/P.1	12	92,31		
		016/P.3	1	7,69		
NT*	8	NT/P.1	4	50,00		
		NT/P.3	2	25,00		
		NT/P.10	1	12,50		
		NT/NP	1	12,50		
Total	195		195	100,00		

NC = Não tipável.

NP = Não produtora.

de contaminação e modos de disseminação da *P. aeruginosa* em ambientes hospitalares. Diferentes sistemas têm sido utilizados para tipar estes microrganismos e, entre eles, a sorotipagem e a piocinotipia têm sido amplamente utilizadas^{3,5,8,9,12,13,26}.

O método de identificação sorológica, baseado no estudo dos antígenos somáticos, diferencia atualmente as cepas de *P. aeruginosa* em 17 sorotipos¹⁹; os sorotipos 0:6 e 0:11 têm sido relatados como alguns dos mais frequentemente isolados de casos de infecções^{9, 18, 25}, fato este observado também entre as cepas incluídas neste estudo, isoladas na sua grande maioria de casos de septicemia e meningite.

Como microrganismo oportunista, qualquer sorotipo pode ser a causa de surtos de graves infecções como foi observado por nós com o sorotipo 0:10, responsável por vários casos de meningite, acometendo principalmente crianças menores de um ano, ocorrido em um hospital de São Paulo, em 1974, durante a epidemia de meningite meningocócica.

O método da piocinotipia, utilizado isoladamente ou de forma associada à sorotipagem, introduziu mais um importante marcador epidemiológico na caracterização de cepas de *P. aeruginosa*. Estudos com sistemas combinados revelaram que algumas associações existem entre determinados sorotipos com tipos piocinotípicos específicos^{1, 27, 28}.

As associações que foram encontradas entre sorotipos e piocinotipos foram significantes, uma vez que podemos verificar que cepas pertencentes a um mesmo sorotipo podem pertencer a piocinotipos diferentes. Assim, verificamos que a maioria das cepas, sorotipo 0:6, que foi o mais freqüente entre nós, está associada ao piocinotipo 3 e o restante das cepas está dividido entre outros piocinotipos, tratando-se portanto de cepas diferentes. Já a ocorrência de 100% de associação entre um sorotipo e um piocinotipo sugere tratar-se de uma mesma cepa, como ocorre com os sorotipos 0:11 e piocinotipo 10; sorotipo 0:5 e piocinotipo 1 e sorotipo 0:10 com piocinotipo 1. Portanto, a caracterização de cada um

dos 11 sorotipos em diferentes piocinotipos mostra a importância da utilização conjunta destes dois métodos de tipagem.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Mehdi Sayegani, Diretor do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Saúde do Estado de Nova York, por fornecer as cepas padrões de *P. aeruginosa* para realização da sorotipagem, e ao Dr. J.R.W. Govan, do Departamento de Bacteriologia da Universidade de Edimburgh pela doação das cepas padrão de *P. aeruginosa* para a realização da piocinotipia.

RIALA6/678

VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; LANDGRAF, I.M.; BRANDILEONE, M.C.C. & VIEIRA, V.S.D. — Serotypes and pyocinetypes of *P. pseudomonas aeruginosa* *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):193-198, 1989.

ABSTRACT; 195 *Pseudomonas aeruginosa* strains, most of them isolated from blood and cerebro spinal fluid cultures, were serotyped by slide agglutination test. The serotypes 0:6 and 0:11 were the prevalent types with 25,64% and 20,54% respectively. The serotype 0:10 caused a meningitis outbreak involving mainly children less than one year of age, in 1974 during meningococcal epidemic in São Paulo City. By Fyfe piocina typing method, 12 piocine types were disclosed among the serotypes with the predominance of pyocine types 1,3 and 10 that accounted for almost 90% of all typed strains. It's stressed the combined use of the serological and pyocine typing method in order to differentiate isolates belonging to the same serotype.

DESCRIPTOR: *Pseudomonas aeruginosa*, serotypes, pyocine types.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERGAN, T. — Epidemiological markers for *Pseudomonas aeruginosa*. 1- Serogrouping, pyocine typing and their interrelations. *Actapathol. microbiol. scand.* 81 (b): 70-80, 1973.
2. BODEY, G.P.; BOLIVAR, R.; FAINSTEIN, V. & JADEJA, L. — Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* *Rev. infect. Dis.* 5(2): 279-313, 1983.
3. BROKOPP, C.D.; GOMEZ-LUS, R. & FARMER III, J.J. — Serological typing of *Pseudomonas aeruginosa*; use of commercial antisera and live antigens *J. clin. Microbiol.* 5(6): 640-9, 1977.
4. BRYAN, C.S.; REYNOLDS, K.L. & BRENNER, E.R. — Analysis of 1.186 episodes of Gram-negative bacteriemia in nonuniversity hospitals: the effects of antimicrobial therapy. *Rev. infect. Dis.*, 5(4): 629-38, 1983.
5. COKER, A.O.; ANYIWO, C.E.; LAWAL, S.F.; OGUNBI, O.; LASI, Q.; DANIEL, S.O. & DAWODU, M. — Pyocin types of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infections in Lagos University Teaching Hospital. *J. hosp. Infec.*, 3:87-9, 1982.
6. CROSS, A.; ALLEN, J.R.; BURKE, J.; DUCEL, G.; HARRIS, A.; JOHN, J.; JOHNSON, D.; LEW, M.; MacMILLAN, B.; MEERS, P.; SAKALOVA, R.; WENZEL, R. & TENNEY, J. — Nosocomial infections due to *P. pseudomonas aeruginosa*: review of recent trends. *Rev. infect. Dis.* 5 (Suppl. 5): 5837-45, 1983.
7. CRYZ Jr. S.J. — *Pseudomonas aeruginosa* infections. In: GERMANIER, R. ed. — *Bacterial vaccines*. New York, Academic Press, 1984, p. 317-51.
8. EDMONDS, P.; SUSKINL, R.R.; MacMILLAN, B.G. & HOLDER, I.A. — Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in a burns hospital: surveillance by a combined typing system. *Appl. Microbiol.* 24 (2): 219-25, 1972.
9. FARMER III, J.J.; WEINSTEIN, R.A.; ZIERDT, C.H. & BROKOPP, C.D. — Hospital outbreaks caused by *Pseudomonas aeruginosa*: importance of serogroup 0:11. *J. clin. Microbiol.*, 16 (2): 266-70, 1982.
10. FYFE, J.A.M.; HARRIS, G. & GOVAN, J.R.W. — Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa*, *J. clin. Microbiol.* 20 (1):47-50, 1984.

11. GOVAN, J.R.W. — Pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa*, *Methods Microbiol.*, 10:61-91, 1978.
12. GOVAN, J.R.W. & GILLIES, R.R. — Further studies in the pyocine typing of *Pseudomonas pyocyanea* *J. med. Microbiol.* 2: 17-25, 1969.
13. HECKMAN, M.G.; BABVCOCK, J.B. & ROSE, H.D. - Pyocine typing of *Pseudomonas aeruginosa*: clinical and epidemiologic aspects. *Am. J. clin. Path.* 57:35-42, 1972.
14. JELLARD, C.H. & CHURCHER, G.M. — An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* (*pyocyanea*) infection in a premature baby unit, with observations on the intestinal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in the newborn. *J. Llyg.*, 65: 219-28, 1967.
15. KLASTUSKY, J. — Nosocomial infections due to Gram-negative bacilli in compromised host: considerations for presentation and therapy. *Rev. infect. Dis.* 7 (Suppl. 4): 5552-8, 1985.
16. KOMINOS, S.D.; COPELAND, C.E.; GROSIK, B. & POSTIC, B. — Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital via vegetables. *Appl. Microbiol.*, 24 (4): 567-70, 1972.
17. LANYI, B. & BERGAN, T. - Serological characterization of *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Microbiol.* 10:93-168, 1978.
18. LEGAKIS, N.J.; ALIFEROPOULOU, M.; PAPAVALIIOU, J. & PAPANIKOLAOU, M. — Serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical specimens in relation to antibiotic susceptibility, *J. clin. Microbiol.*, 16 (3): 458-63, 1982.
19. LIU, P.V.; MATSUMOTO, H.; KUSAMA H. & BERGAN, T. — Survey of heat-stable, major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*, *Int. J. syst. Bacteriol.* 33 (2): 256-64, 1983.
20. MORRISON JR., A.S. & WENZEL, R.P. — Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Rev. Infect. Dis.*, 6 (Suppl.3): 5627-42, 1984.
21. NAKAHARA, H. & KOZUKUE, H. — Isolation of chlorhexidine-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from clinical lesions. *J. clin. Microbiol.*, 15(1): 166-8, 1982.
22. NEW, H.C. — Infections due to Gram-negative bacteria: an overview. *Rev. infect. Dis.*, 7 (Suppl.4): 5778-82, 1985.
23. PALLERONI N.J. — Genus I — *Pseudomonas* *Mi-gula* 1894, 237^{AL}. In: BERGEY'S manual of systematic bacteriology, Baltimore, William & Wilkins, 1986. p. 141-99.
24. REYNOLDS, H.Y.; LEVINE, A.S.; WOOD, R.E.; ZIERDT, C.H.; DALE, D.C. & PENNINGTON, J.E. — *Pseudomonas aeruginosa* infections: persisting problems and current research to find new therapies. *Ann. intern. Med.* 82: 819-31, 1975.
25. SHERERTZ, R.J. & SARUBBI, F.A. — A three years study of nosocomial infections associated with *Pseudomonas aeruginosa* *J. clin. Microbiol.* 18 (1): 160-4, 1984.
26. VEGA, C.C.; CHÁVEZ, J.; PADILLA, M.E.; RIVERA, A.N. & VACA, S. — Piocin types of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Mocrlia, Mexico (1980-1984). *Rev. latinoam. Microbiol.* 28: 287-91, 1986.
27. WAHBA, A.H. — Hospital infection with *Pseudomonas pyocyanea*: an investigation by a combined pyocine and serological typing method. *Br. med. J.*, 1: 86-9, 1965.
28. WAHBA, A.H. — Pyocine typing of *Pseudomonas pyoceanea* and its relation to serological typing. *Zentralbl. Bakteriol. I. Abt. Orig.* 196: 389-94, 1965.
29. WHITBY, J.L. & RAMPLING, A. — *Pseudomonas aeruginosa* contamination in domestic and hospital environments. *Lancet*, 1 (7740): 15-7, 1972.

Recebido para publicação em 7 de junho de 1989.

INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA EM CASOS DE CONJUNTIVITE
HEMORRÁGICA AGUDA EM REGIÕES DO ESTADO DE
SÃO PAULO, BRASIL, 1984*

Sueko TAKIMOTO**
Eliseu Alves WALDMAN**
Margueritte S. PEREIRA***+
Mary O. ROEBUCK***
Maria Akiko ISHIDA**
Terezinha M. PAIVA**
Laercio J. GERBI**
Heloisa H.G.B. MELLES**
Tuneo ISHIMARU**

RIALA6/679

TAKIMOTO, S.; WALDMAN, E.A.; PEREIRA, M.S.; ROEBUCK, M.O.; ISHIDA, M.A.;
PAIVA, T.M.; GERBI, L.J.; MELLES, H.H.G.B. & ISHIMARU, T. — Investigação
etiológica em casos de conjuntivite hemorrágica aguda em regiões do Estado de
São Paulo, Brasil, 1984. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):199-205, 1989.

RESUMO: Nos meses de janeiro a março de 1983 e de 1984 ocorreram sucessivamente duas epidemias de conjuntivite hemorrágica aguda (C.H.A.) no Estado de São Paulo, a primeira atingindo exclusivamente a área litorânea e a segunda, mais extensa, abrangendo também regiões do planalto. A presente investigação apresenta dados sobre aspectos etiológicos da epidemia de C.H.A. ocorrida em 1984. Foram examinadas amostras pareadas de soro de 73 pacientes para a pesquisa de anticorpos e amostras da secreção conjuntival de 179 casos com C.H.A., para a tentativa de isolamento de vírus provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo. Houve conversão sorológica em 45,2% dos 73 pacientes examinados e presença de anticorpos específicos para EV-70 sem conversão sorológica em outros 19,2%. As proporções mais elevadas de casos positivos situaram-se entre pacientes maiores de 20 anos, com taxas de 70,6% para o grupo etário de 20 a 29 anos, de 55,6% na faixa de 30 a 39 anos e de 72,7% em maiores de 40 anos. Foram isoladas de amostras de secreção conjuntival 7 cepas de adenovírus, 1 de herpes-simples e 1 de EV-70. Nenhum dos soros pareados examinados foi positivo para adenovírus e, nos casos em que esses vírus foram isolados, não foi possível obter soros pareados para a comprovação sorológica de infecção. Os resultados obtidos confirmam a participação de EV-70 nessa epidemia. Não foram identificadas complicações neurológicas associadas à infecção pelo EV-70.

DESCRITORES: enterovírus-70, conjuntivite hemorrágica aguda, agente etiológico.

INTRODUÇÃO

A conjuntivite hemorrágica aguda (C.H.A.) descrita pela primeira vez em GHANA, África, em 1969¹⁰, caracteriza-se clinicamente por uma conjuntivite exsudativa, dolorosa, frequentemente

acompanhada de hemorragia subconjuntival. Manifestações sistêmicas são pouco significativas e a cura ocorre entre o 4º e o 7º dia de doença. Apresenta alta transmissibilidade e o período de incubação é curto, situando-se em torno de 24 a 48 horas. Comporta-se na comuni-

* Realizado no serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

***+ Virus Reference Laboratory, Colindale, Londres, Grã-Bretanha (in memoriam).

*** Virus Reference Laboratory, Colindale, Londres, Grã-Bretanha.

dade, na maioria das vezes, sob forma de epidemia de início abrupto.

Em 1970, uma epidemia de C.H.A. atingiu Singapura, durante a qual foi isolado um picornavírus, classificado como variante do coxsackievírus A-24 (CA-24)¹⁵. No ano seguinte, novas epidemias de C.H.A. são identificadas em diversas regiões da Ásia e outro picornavírus, até então desconhecido, é isolado, recebendo a denominação de enterovírus-70 (EV-70)^{8,12,13}.

Sabe-se hoje que a C.H.A. pode ser causada por esses dois enterovírus e, ainda, com menor frequência, pelo adenovírus tipo 11, que tem sido isolado durante algumas epidemias em que predominou o EV-70^{1,8}.

A introdução da C.H.A. no Brasil ocorreu em 1981 com epidemias atingindo os Estados do Pará, Amazonas e território Federal do Amapá^{6,17}. Entre o final de 1982 e o início de 1983, episódio semelhante ocorre no Estado de Mato Grosso, comprovando-se a participação de EV-70¹⁸. No verão de 1983 esse agravo é identificado pela primeira vez no Estado de São Paulo, acometendo sua área litorânea, especialmente a Baixada Santista. A investigação etiológica dessa epidemia não foi conclusiva por dificuldades operacionais.

A presente pesquisa tem por objetivo estudar aspectos etiológicos da segunda epidemia de C.H.A. ocorrida no Estado de São Paulo, abrangendo não só o litoral, mas também regiões do planalto.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de janeiro a março de 1984, as autoridades sanitárias do Estado de São Paulo receberam notificações de epidemias de C.H.A. nas regiões da Grande São Paulo, Baixada Santista, Sorocaba, Campinas, Ribeirão Preto e Vales do Ribeira e do Paraíba.

Com o objetivo de conhecer o agente etiológico dessas conjuntivites, providenciou-se o envio, ao Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL), de 73 amostras pareadas de soros, e secreção conjuntival de 179 pacientes atingidos pela moléstia.

As secreções conjuntivais foram colhidas asepticamente de pacientes na fase aguda da doença, imersos em meio de transporte GLY (glicose, lactalbumina, extrato de levedura) encaminhados imediatamente ao laboratório a 4°C onde foram estocados a -70°C, até serem inoculados em cultura de células.

A primeira amostra de sangue foi colhida na fase aguda da doença e a segunda cerca de 20 dias após. O sangue foi adequadamente centrifugado e o soro armazenado a -20°C.

Para a tentativa de isolamento do vírus, a secreção da conjuntiva foi inoculada em cultura de células BHK-21, HEp2, Vero e MDCK com leituras a cada 2 dias para verificação de efeito citopático. Após 14 dias em observação, foi feita a segunda passagem cega, seguida de terceira passagem após 14 dias. De 10 amostras de secreção conjuntival de doentes, foram enviadas alíquotas ao "Virus Reference Laboratory", Colindale, Londres, Grã-Bretanha, para a tentativa de isolamento onde seria utilizada MRC-5, cultura de células mais sensível à multiplicação do enterovírus 70.

Para a pesquisa de anticorpos específicos para EV-70 foi utilizada a técnica de microneutralização. O EV-70 (gentilmente cedido pela Dra. Marguerite S. Pereira, do "Virus Reference Laboratory", Colindale, Londres, Grã-Bretanha), utilizado como antígeno, foi replicado em cultura de células BHK-21 e titulado pelo método de REED e MUENCH¹⁴. A reação foi efetuada em microplacas de poliestireno, fazendo diluições seriadas de 25 µl de soros em duplicatas a partir de 1/8 a 1/128 aos quais foram adicionadas 100 TCD 50/25 µl de vírus. Após a incubação por 1 hora a 37°C adicionou-se à suspensão de células (100.000 cel./50 µl) em meio de Eagle com 5% de soro de galinha. Posteriormente, as placas foram mantidas em estufa a 35°C e feitas leituras diárias ao microscópio. A ausência de efeito citopático no poço contendo soro mais vírus, quando o controle de vírus apresentava um título de 32 a 100 TCD50 na titulação simultânea, foi considerado como positivo. A elevação de 4 vezes ou mais no título de anticorpos na segunda amostra de soro, quando comparada com a primeira, foi considerada como conversão sorológica positiva.

Para a detecção de anticorpos para adenovírus foi utilizada a reação de fixação do complemento pela microtécnica já descrita anteriormente⁷.

RESULTADOS

Foram examinadas amostras pareadas de soros de 73 pacientes residentes nas regiões da Grande São Paulo, Baixada Santista e Vale do Paraíba, verificando-se conversão sorológica em teste de neutralização para EV-70 em, respectivamente, 25% e 66,7% dos casos, observada a mesma ordem de origem (tabela 1). Observou-se também a presença de anticorpos neutralizantes sem conversão sorológica em 20,5% e 18,2% dos pacientes das regiões da Grande São Paulo e da Baixada Santista, respec-

TABELA 1

Anticorpos neutralizantes para enterovírus-70 em soros de pacientes com C.H.A. em regiões do Estado de São Paulo, Brasil. 1984

Regiões	Soros pareados			
	Positivos		Negativos Nº (%)	Total Nº (%)
	com conversão Nº (%)	sem conversão Nº (%)		
Grande São Paulo	10 (25%)	8 (20,5%)	21 (53,8%)	39 (100%)
Baixada Santista	22 (66,7%)	6 (18,2%)	5 (15,1%)	33 (100%)
Vale do Paraíba	1 (100%)	—	—	1 (100%)
Total de amostras	33 (45,2%)	14 (19,2%)	26 (35,6%)	73 (100%)

* Dos 39 pacientes, 32 eram escolares na faixa etária de 7 a 14 anos, dos quais 6 (18,7%) apresentaram conversão sorológica para EV-70 e em 9 (28,1%) verificou-se presença de anticorpos nas duas amostras.

TABELA 2

Anticorpos neutralizantes para enterovírus-70 em soros de pacientes com C.H.A. em regiões do Estado de São Paulo segundo a faixa etária. 1984.

Faixa etária (anos)	Anticorpos neutralizantes em soros pareados			
	Positivos		Negativos Nº (%)	Total Nº (%)
	com conversão Nº (%)	sem conversão Nº (%)		
0-4	—	—	—	—
5-9	4 (30,8%)	1 (7,7%)	8 (61,5%)	13 (100%)
10-19	4 (17,4%)	6 (26,1%)	13 (56,5%)	23 (100%)
20-29	12 (70,6%)	3 (17,6%)	2 (11,8%)	17 (100%)
30-39	5 (55,6%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)	9 (100%)
≥ 40	8 (72,7%)	2 (18,2%)	1 (9,1%)	11 (100%)
Total de amostras	33 (45,2%)	14 (19,2%)	26 (35,6%)	73 (100%)

tivamente (tabela 1). Vale salientar que dos 39 pacientes estudados na região da Grande São Paulo, 32 eram crianças da faixa etária de 7 a 14 anos que freqüentavam escola de primeiro grau, localizada em área periférica do Município de São Paulo, onde ocorreu um surto de C.H.A. Destas crianças, (18,7%) apresentaram conversão sorológica para EV-70 e em outras 9 (28,1%) verificou-se a presença de anticorpos neutralizantes específicos já na primeira amostra sem a correspondente conversão sorológica.

Na tabela 2 observa-se que as faixas etárias que apresentaram maiores taxas de conversão sorológica foram aquelas situadas acima de 20 anos de idade com freqüências variando de 55,6% a 72,7%. A proporção de indivíduos que apresentavam anticorpos neutralizantes sem conversão

sorológica variou entre 7,7% no grupo etário de 5 a 9 anos e 26,1% no de 10 a 19 anos.

Processaram-se 179 amostras de secreção conjuntival originárias de 7 diferentes regiões do Estado na tentativa de isolamento de vírus. Em 9 delas foi possível o isolamento, sendo 7 adenovírus, 1 herpes simples e um 1 EV-70, este último obtido de paciente residente na Baixada Santista, região litorânea do Estado (tabela 3). O EV-70 foi isolado a partir de uma das 10 amostras da secreção enviadas ao "Virus Reference Laboratory", Colindale, Londres.

Em 43 das 170 amostras apresentadas na tabela 3 como negativas, verificaram-se alterações nas células BHK-21, porém não foi possível comprovar a presença de vírus.

TABELA 3

Isolamento de vírus a partir de amostras de secreção conjuntival de pacientes com C.H.A. de regiões do Estado de São Paulo, Brasil, 1984.

Regiões	Vírus isolados			Negativos	Total
	AD	HS	EV-70		
Grande São Paulo	5	1	-	85	90
Sorocaba	-	-	-	4	4
Baixada Santista	-	-	1	57	58
Campinas	-	-	-	3	3
Ribeirão Preto	-	-	-	5	5
Vale do Paraíba	1	-	-	6	7
Vale do Ribeira	1	-	-	11	12
Total de amostras	7	1	1	170	179

AD - adenovírus.

HS - herpes simples.

EV-70 - enterovírus 70.

Não foi identificada nenhuma afecção neurológica aguda no grupo de pacientes incluídos na presente pesquisa.

Reação sorológica de fixação de complemento realizada nesses mesmos soros pareados não detectou conversão sorológica para o grupo dos adenovírus. Lamentavelmente, não foram coletados soros pareados de 7 pacientes dos quais foram isolados adenovírus.

DISCUSSÃO

Os EV-70 e CA-24 constituem hoje amplo e interessante campo para estudos multi e interdisciplinares, fato que pode ser facilmente identificável à luz dos conhecimentos já disponíveis.

Ambos os vírus emergiram, como patogênicos à população humana, praticamente na mesma época e lugar, determinando idêntica doença, a C.H.A. Diferem, porém, quanto a determinados aspectos do comportamento clínico-epidemiológico, merecendo destaque a associação do EV-70 com afecções neurológicas agudas numa proporção estimada de 1/10.000 casos de C.H.A. e ao fato desse vírus determinar, periodicamente, verdadeiras pandemias, enquanto o CA-24-V não ocasiona quadros paralíticos e atinge a população causando epidemias localizadas. Ambos pertencem à família *Picornaviridae*, porém são distintos quanto às suas características imunogênicas e de estrutura molecular, existindo a possibilidade de que o EV-70 constitua, na rea-

lidade, não um único vírus mas um grupo de vírus relacionados^{3,8,9}.

A origem e a forma pela qual esses dois vírus introduziram-se na população humana é desconhecida. Existem evidências obtidas por meio de levantamentos sorológicos de que ambos teriam emergido, à semelhança do que ocorre com o vírus da influenza, provavelmente por mutação de vírus animais, entre eles de gatos e porcos².

O EV-70 comporta-se de forma diferente dos demais enterovírus, uma vez que se replica em culturas de células não originadas de primatas²⁰, o que reforça a hipótese de ter sua origem em populações animais.

O isolamento do CA-24 é mais fácil do que o EV-70, podendo ocorrer em cerca de 40% das amostras quando inoculado em cultura de células Hela, Hep-2 e HLF. O EV-70 é um vírus de difícil isolamento, com possibilidade de algum sucesso quando a amostra é colhida nas primeiras 24 horas de doença, citando-se entre as linhagens celulares mais sensíveis fibroblasto de pulmão de feto humano. Algumas cepas de CA-24 determinam paralisias em camundongos recém-nascidos, fato não verificado para EV-70.

Tem sido salientado que EV-70 foi isolado com alguma frequência durante as pandemias de C.H.A. ocorridas na década de 70, enquanto que raros têm sido os isolamentos desse vírus a partir de 1980⁵, apesar da sua participação ter sido comprovada sorologicamente em diversas epidemias ocorridas em diferentes continentes. Esse

comportamento é explicado como decorrente da imunidade conferida à população por infecções anteriores, o que determinaria a neutralização do vírus, dificultando ou impedindo o seu isolamento. Essa hipótese não se mostra consistente, ao menos em relação às Américas, pois este continente foi atingido pelo vírus somente a partir de 1979 e o número descrito de isolamentos é restrito.^{1,4,6,8,14,16,17,23}

As áreas mais vulneráveis à C.H.A. são as regiões tropicais, geralmente em sua porção litorânea, com alta densidade populacional e condições de promiscuidade e de higiene inadequadas. Determinadas características do ambiente, como a alta temperatura e a umidade relativa do ar elevada, favoreceriam a disseminação do EV-70 e do CA-24-V. No entanto, isto não impediu que regiões de clima frio e distantes do litoral fossem atingidas⁸.

Analisando os resultados da presente pesquisa, verificamos a conversão sorológica para EV-70 em 66,7% e 25% dos casos estudados, respectivamente, na Baixada Santista e na região da Grande São Paulo, resultado que nos permite confirmar a participação desse vírus na epidemia de C.H.A. ocorrida em diversos pontos do Estado de São Paulo, durante o verão de 1984.

Os 19,2% de indivíduos com anticorpos para EV-70 sem conversão sorológica e, especialmente, os baixos títulos verificados entre eles, sugerem a possibilidade de uma infecção anterior. Essa informação, acrescida de concomitância da epidemia ocorrida no verão de 1983, no litoral do Estado de São Paulo, com episódio semelhante em Mato Grosso¹⁸, onde foi confirmada a presença de EV-70, e da identificação, no município de São Paulo, entre março e julho de 1983, de casos de C.H.A. associados à infecção por esse vírus, torna consistente a hipótese de que a primeira epidemia de C.H.A., ocorrida no Estado de São Paulo em 1983, resultou da circulação do EV-70^{1,14}.

Cabe salientar que dos 39 indivíduos examinados, residentes na região da Grande São Paulo, 32 eram estudantes de uma única escola de pri-

meiro grau, localizada na área periférica do município de São Paulo, onde ocorreu um surto de C.H.A. A idade dessas crianças, variando entre 7 e 14 anos, pode explicar a baixa taxa de casos positivos para EV-70, pois esta faixa etária apresenta menor risco de infecção por esse enterovírus.

A distribuição dos pacientes que apresentaram conversão sorológica, segundo faixa etária, é compatível com aquela relatada na literatura. No entanto, ressalta-se o fato de essa mesma distribuição, entre os indivíduos com anticorpos mas sem conversão sorológica, não apresentar taxas de positividade dentro de um parâmetro proporcionalmente semelhante, especialmente a partir do grupo etário acima de 18 anos.

O resultado talvez mais notável da presente investigação diz respeito ao isolamento de uma cepa de EV-70 de paciente residente na Baixada Santista. Esta foi a única vez, no Brasil, em que este vírus foi isolado entre as poucas relatadas na literatura americana nesta década, comprovando de forma inofismável a introdução deste agente em nosso continente. O fato de ter sido isolada uma única cepa em 179 amostras examinadas pode ser explicado, em parte, porque a coleta da amostra não foi, muitas vezes, efetuada nas primeiras 24 horas da doença e talvez por problemas de conservação no transporte da amostra.

As dificuldades operacionais para o isolamento do EV-70 e para obtenção em condições adequadas de amostras pareadas de soro para testes de neutralização evidenciam a necessidade do desenvolvimento e padronização de técnicas imunoenzimáticas e de imunofluorescência para a demonstração de anticorpos específicos da classe IgM²⁴. Tais imunoglobulinas podem ser detectadas até 4ª semana após o início da doença em grande número de pacientes atingidos pela C.H.A.

Aspectos importantes da clínica e epidemiologia do EV-70 ainda pouco estudados dizem respeito às complicações neurológicas associadas à infecção por esse vírus, ao seu comportamento nas fases "silenciosas" da C.H.A. e, por fim, aos fatores que desencadeiam as epidemias^{21, 22}.

RIALA6/679

TAKIMOTO, S.; WALDMAN, E.A.; PEREIRA, M.S.; ROEBUCK, M.O.; ISHIDA, M.A.; PAIVA, T.M.; GERBI, L.J.; MELLES, H.H.G.B. & ISHIMARU, T. - Etiologic study of acute haemorrhagic conjunctivitis in regions of São Paulo State, Brasil, 1984. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):199-205, 1989.

ABSTRACT: Epidemics of acute haemorrhagic conjunctivitis occurred in the São Paulo State limited to the sea coast areas in 1983 which was succeeded by epidemics in other regions of the state in 1984. The present investigation presents data on the etiological aspects of conjunctivitis during the epidemic of 1984. Paired sera of 73 cases and conjunctival swabs of 179 patients living in different regions of São Paulo state were examined for respectively, serology and virus isolation attempts. Neutralization test detected serologic conversion for EV-70 in 45,2% of patients examined while 19,2% had antibodies in the acute phase sera. Persons older than 20 years were the most affected by the virus. The proportion of positive cases in the age groups of 20-29, 30-39 and older than 40 were respectively, 70,6%, 55,6% and 72,7%. Adenovirus, herpes simples and EV-70 were isolated from the conjunctival secretion of seven, one and one patients, respectively. Despite adenovirus have been isolated of higher number of cases serologic tests did not detect any adenoviral infection, due to the unavailability or paired sera of persons from which adenoviruses were isolated. The results obtained confirm the participation of EV-70 in the epidemic of 1984. During this period no evidence of neurological diseases were registred.

DESCRIPTORS: enterovirus-70, acute haemorrhagic conjunctivitis, etiologic agent.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOKI, K.; KAWANA, R.; MATSUMOTO, I.; MAEKAWA, H.; SAWADA, H.; SAKURADA, N.; NOBREGA, M.J.; DELREY Filho, M. & BELFORT Jr., R. — An epidemic of acute haemorrhagic conjunctivitis in the city of São Paulo. *Ja. J. Ophthalmol*, 31:532-7, 1987.
2. CHRISTIE, A.B. - Changing aspects of infectious diseases (acute haemorrhagic conjunctivitis; acquired immune deficiency syndrome) In: CHRISTIE, A.B. *Infectious diseases: epidemiology and clinical practice*, 4th ed., 1987. p.22-42.
3. CHRISTIE, A.B. - Enterovirus Infections (coxsackie virus and echovirus) In: CHRISTIE, A.B. *Infectious diseases epidemiology and clinical practice*, 4th ed., 1987. p.753-81.
4. CENTER FOR DISEASES CONTROL. — Acute haemorrhagic conjunctivitis caused by *Coxsackievirus A-24*- Caribbean. *JAMA*, 257(22): 3039-40 1987.
5. DESMYTER, J.; COLAERT, J.; MAERTEND. K. & MUYEMBE, T. — *Enterovirus-70* haemorrhagic conjunctivitis in Zaire, 1981 versus 1972. *Lancet*, 1054-55, nov. 5, 1981.
6. GABBAY, Y.B.; FREITAS, R.B.; SANTOS, E.C.D. & LINHARES, A.C. — Surto de conjuntivite hemorrágica aguda em Belém, Par  (Nota Pr via). *Rev. paul. Med.*, 3(2): 93-6, 1981.
7. HAWKES, R.A. — General principals underlying laboratory diagnosis of viral infections. In: *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamidial Infections*, 5 th ed. Lennette, E.H. & Schmidt, N.J. p. 35-42, 1979.
8. HIERHOLZER, J.C.; HILLIARD, K.A. & ESPOSITO, J.J. — Serosurvey for "acute haemorrhagic conjunctivitis" virus (EV-70) antibodies in the south-eastern United States, with review of the literature and some epidemiologic implications. *Am. J. Epidemiol*, 102(6): 633-44, 1975.
9. HIGGINS, P.G.; SCOTT, R.J.; DAVIES, P.M. & GAMBLE, D.R. — A comparative study of viruses associated with acute haemorrhagic conjunctivitis. *J. clin. Pathol*, 27(4): 292-6, 1974.
10. KAIWAR, R.; PAL, S.R.; GANGWAR, D.N.; SEHGAL, A.K. & BISWAS, J. — Sporadic cases of acute haemorrhagic conjunctivitis due to Enterovirus type 70. *Indian J. med. Res.*, 78:445-9, 1983.
11. KONO, R. — On the causative agent of acute haemorrhagic conjunctivitis and its epidemiology. *Acta. Soc. Ophthalmol. Jap.*, 78(7):333-41, 1974.
12. KONO, R.; SASAGAWA, A.; ISHII, R.; SUGIURA, S.; UCHIDA, Y.; KAMEYA, M.A.K. & KANEKO, M. — Pandemic of new type of conjunctivitis. *Lancet*. 1191-94, Jun. 3, 1972.
13. MIRKOVIC, R.R.; SCHMIDT, J.J.; YIN-MURPHY, M & MELNICK, J.L. — Enterovirus etiology of the 1970 Singapore epidemic of acute conjunctivitis *Intervirology*, 4: 119-27, 1974.
14. NOBRECA, M.Y.; DEL REY Filho, M.; BELFORT Jr., R. AOKI, K.; KAMANA, R.; MATSUMOTO, I.; MAEKANA, H.; SWABA, H. el SAKURADA, N. — Estudo prospectivo de casos de conjuntivite viral aguda na cidade de São Paulo. Caracteriza o do *Enterovirus - 70* (Con juntivite Hemorrágica Agudra). *Rev. Assoc. Brasil.* 32(3/4): 47-50, 1986.
15. REED, L.J. & MUENCH, H. — A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg*, 27: 493-7, 1938.

16. REEVES, W.C.; BRENES, M.M.; QUIROZ, E.; PALACIOS, Y.; CAMPOS, G. & CENTENA, R. — Acute haemorrhagic conjunctivitis epidemic in Colon, Republic of Panama. *Am. J. Epidemiol.* 123(2): 325-35, 1983.
17. SANTOS, E.C.O.; GABBAY, I.B.; FREITAS, R.B. & LINHARES, A.C. — Surto de conjuntivite hemorrágica aguda no norte do Brasil. *Bol. Epidemiol.* 15 (2): 11-9, 1983.
18. SANTOS, E.O.; MACEDO, O.; GOMES, M.L.C. & NAKAUT, C.M. — Conjuntivite hemorrágica aguda, em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, 1983. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 29 (1): 47-52, 1987.
19. YIN-MURPHY, M. An epidemic of picornavirus conjunctivitis in Singapore. *Southeast Asian J. trop. Med. pub. Health*, 3 (3): 303-9, 1972.
20. YOSHII, T. NATORI, K. 7 KONO, R. - Replication of Enterovirus — 70 in non primate cell cultures. *J. gen. Virol*, 36: 377- 84, 1977.
21. WADIA, N.H.; KATRAK, S.M.; MISRA, V.P.; WADIA, P.N.; MIYAMURA, K.; HASHIMOTO, K.; OGINO, T.; HIKUI, T. & KONO, R. — Polio-like motor paralysis associated with acute haemorrhagic conjunctivitis in a outbreak in 1981 in Bombay, India: clinical and serologic studies. *J. infect. Dis.*, 147(4): 660-8, 1983.
22. WADIA, N.H.; WADIA, P.N.; KATRAK, SM.; MISRA, V.P. — Neurological manifestation of acute haemorrhagic conjunctivitis. *Lancet*. I: 528-29, suppl. 5, 1981 (letter).
23. WATERMAN, S.H.; CASA-BENABE, R.; HATCH, M.H.; BAILEY, R.E.; MUNOZ-JIMENEZ, R.; RAMIREZ-RAMIRETE, R. & RODRIGUES-BIGAS, M. — Acute haemorrhagic conjunctivitis in Puerto Rico, 1981-1982. *Am. J. Epidemiol.*, 120(2): 395-403, 1984.
24. WULFF, H.; ANDERSON, O.Y.; PALLANSCH, M.A. 7 CARVALHO, R. - P.S. Diagnosis of enterovirus-70 infection by demonstration of IgM antibodies. *J. med. Virol.*, 21:321-7, 1987.

Recebido para publica o em 10 de agosto de 1989

CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA DE *FLAVOBACTERIUM*
*MENINGOSEPTICUM**

Tânia Mara Ibelli VAZ **
Kinue IRINO**
Chifumi Takeuchi CALZADA**
Célia Rodrigues GONÇALVES**

RIALA6/680

VAZ, T.M.I.; IRINO, K; CALZADA, C.T. & GONÇALVES, C.R. - Caracterização sorológica de *Flavobacterium meningosepticum*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 49 (2):207-211, 1989.

RESUMO: 22 cepas de *Flavobacterium meningosepticum*, sendo 19 isoladas de líquido cefalorraquidiano, 2 de sangue e 1 de secreção traqueal, de diferentes procedências, foram sorotipadas por aglutinação em lâmina, utilizando soros somáticos específicos, preparados segundo o método descrito por RICHARD et alii. As cepas, isoladas na sua grande maioria de crianças recém-nascidas, foram classificadas em 6 sorotipos, sendo o sorotipo C o mais freqüente, seguido de F, B, D, H e O. A meningite neonatal, embora de ocorrência rara, é uma doença de alta letalidade que deixa graves seqüelas. A caracterização das cepas responsáveis pelos surtos epidêmicos ocorridos nos diversos países tem sido realizada pela identificação dos sorotipos, que são principais marcadores epidemiológicos de *F. meningosepticum*.

DESCRIPTORES: *Flavobacterium meningosepticum*, sorotipos, meningite neonatal.

INTRODUÇÃO

Bacilos Gram negativos, aeróbios estritos, anteriormente conhecidos como Grupo IIa até a sua classificação como *F. meningosepticum*, proposta por KING em 1959¹¹, estão presentes no solo, água e ambiente hospitalar. Caracterizam-se por serem sensíveis aos antibióticos normalmente utilizados nas enfermidades por bactérias Gram positivas, sendo sobretudo sensíveis à eritromicina e à vancomicina^{1,13,16,18}. A principal infecção causada por este agente está relacionada à meningite em recém-nascidos ou prematuros. Surtos epidêmicos de meningite neonatal, que se caracteriza por apresentar alta taxa de mortalidade e deixar graves seqüelas, foram descritos por vários autores em diferentes países^{4,5,7,8,14,18,22,24}, sendo que o primeiro caso de meningite por *F. meningosepticum* em prematuros foi descrito em

1944 por SCHULMAN & JOHNSON²⁰. Infecções em adultos são mais raras, atingindo principalmente pacientes debilitados, característica comum de bactérias oportunistas. Entre as infecções relatadas em adultos, estão descritos casos de pneumonia²³ bacteriemia pós-operatória^{2,17}, meningite^{11, 12, 14, 15} e infecção cutânea³.

A homogeneidade de caracteres fenotípicos e a falta de marcadores epidemiológicos para diferenciação de cepas de *F. meningosepticum*, tornam a sorotipagem um método de importância primordial no estudo de infecções causadas por este microrganismo. Com objetivo de determinar os sorotipos prevalentes no nosso meio, foram estudadas as cepas de *F. meningosepticum*, a maioria isolada de líquido cefalorraquidiano, através da soroadglutinação em lâmina.

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas bacterianas — Foram estudadas 22 cepas de *F. meningosepticum*, sendo 19 isoladas de líquido cefalorraquidiano, 2 de sangue e 1 de secreção traqueal, que na sua maioria foram procedentes das cidades de São Paulo (SP) e Ribeirão Preto (SP); as outras foram recebidas de Taubaté (SP), de Porto Velho (RO), de Brasília (DF) e de Florianópolis (SC). Para a identificação da espécie foram utilizados os caracteres que constam do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology¹⁰.

Métodos de identificação bioquímica

Para a definição do gênero e classificação em espécie, foram observadas as características morfológicas e tintoriais, as reações de oxidase, catalase e as provas bioquímicas para verificar a oxidação dos carboidratos, a presença de enzimas extracelulares, a hidrólise da esculina e do ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo).

Método de identificação sorológica

Preparo de antissoros — Os antissoros foram preparados utilizando-se cepas padrões de *F. meningosepticum* recebidas do Institut Pasteur, Paris, segundo o método descrito por RICHARD et alii¹⁹. As cepas foram cultivadas em ágar comum e incubadas em estufa a 30°C por 48 horas. O crescimento bacteriano foi suspenso em solução fisiológica e aquecido em banho-maria fervente, por uma hora a fim de eliminar os eventuais antígenos de superfície. As suspensões bacterianas, contendo aproximadamente 10⁹ bactérias/ml, foram injetadas em coelhos por via endovenosa. O esquema de imunização utilizado foi: 0,5 ml, seguido de 1,0, 2,0, 3,0 e 3,0 ml, com intervalo de 4 dias entre as inoculações. A sangria dos coelhos foi feita 6 dias após a última inoculação. Os soros foram titulados em lâmina e as reações cruzadas eliminadas por absorção. Após a adição de mertiolato a 1/10.000, foram conservados a +4°C.

Tipagem das cepas — As cepas foram cultivadas em ágar comum e incubadas durante 48 horas a 30°C em estufa. A tipagem das cepas foi realizada através da técnica de aglutinação em lâmina, utilizando os antissoros específicos.

RESULTADOS

Todas as cepas cresceram em meios de cultura comuns (ágar e caldo comum). Em ágar comum, após um período de incubação de 18-24 horas a 37°C, as colônias, com diâmetro de 1-2 mm,

apresentavam superfície lisa, com bordos regulares, convexa e opaca. Algumas cepas, após uma incubação prolongada à temperatura ambiente, desenvolveram colônias com pigmentação amarelada não difusível no meio da cultura. Ao exame microscópico, após a coloração de Gram, observou-se a presença de bacilos Gram negativos, finos, com extremidades arredondadas, e também, foram vistas com frequência formas longas e filamentosas. Todas as cepas se caracterizaram por serem imóveis, aeróbias estritas, oxidase e catalase positivas, sendo classificadas como *Flavobacterium meningosepticum*, através das seguintes características:

Oxidação de carboidratos:

glicose +
maltose +
manita +
lactose + (tardamente)
trealose + (maioria)

Hidrólise de:

esculina +
ONPG +

Enzimas:

DNase +
gelatinase +
triptofanase +
urease -
nitrito redutase -

Das 22 cepas identificadas como *F. meningosepticum*, 18 (81,8%) foram classificadas em 6 diferentes sorotipos, sendo o sorotipo C o mais freqüente, com 61,1%, seguido dos sorotipos F, B, D, H e O e quatro não-tipáveis. A distribuição dos sorotipos, por material e por faixa etária, está apresentada na tabela 1.

TABELA 1

Distribuição, por material e faixa etária, dos sorotipos de *F. meningosepticum*

Material Faixa Etária Sorotipo	LCR (19)			Sangue (2)			Sec. traq. (1)			Total
	0-5m	ad.	i.d.	0-5m	ad.	i.d.	0-5m	ad.	i.d.	
B	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
C	9	—	1	1	—	—	—	—	—	11
D	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1
F	1	—	1	—	—	1	—	—	—	3
H	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1
O	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
NT	2	2	—	—	—	—	—	—	—	4
Total	13	2	4	1	—	1	1	—	—	22

m = meses

ad = adulto

i.d. = idade desconhecida

NT = não-tipável

Sec. traq. = secreção traqueal

Quanto à faixa etária dos pacientes, das 22 cepas estudadas, 15 foram isoladas de crianças menores de 5 meses de idade, sendo 13 recém-nascidos, 1 de 1 mês e 12 dias e 1 de 5 meses.

Todas as cepas do sorotipo C procederam das cidades do Estado de São Paulo. As cepas pertencentes aos sorotipos D, H e O de Santa Catarina, Rondônia e Distrito Federal, respectivamente. Cepas pertencentes ao sorotipo F das cidades de São Paulo (SP) e Porto Velho (RO).

DISCUSSÃO

Surtos epidêmicos de meningite neonatal por *F. meningosepticum* têm sido relatados em diversos países^{4, 5, 8, 18, 24}. No Brasil, o primeiro caso de meningite por este microrganismo foi descrito por SOLÉ-VERNIN et alii em 1960²¹. Em 1970, MADRUGA et alii¹⁴ relataram a ocorrência de um surto epidêmico em um hospital do Rio de Janeiro com sete casos fatais de meningite purulenta. CAUDURO⁶, em 1978, descreveu cinco casos de meningite por *F. meningosepticum* em recém-nascidos e prematuros, ocorridos em um hospital de Porto Alegre, RS.

Os casos relatados por MADRUGA et alii foram causados por cepas de *F. meningosepticum* antigenicamente relacionados aos tipos A, B e F, enquanto os tipos encontrados por CAUDURO foram D e E. Estudos epidemiológicos de infecções por *F. meningosepticum* ocorridas em enfermarias de recém-nascidos^{5, 9, 11, 16, 24} têm revelado que o sorotipo C é o mais frequentemente isolado dentre os 15 sorotipos atualmente reconhecidos. Entre as cepas incluídas neste estudo, o sorotipo C também foi o mais freqüente, representando mais de 60% das cepas.

A meningite por *F. meningosepticum*, embora rara, atinge normalmente de forma epidêmica os recém-nascidos, e os estudos utilizando os sorotipos como marcadores epidemiológicos têm demonstrado que o ambiente hospitalar constitui a principal fonte de infecção desses pacientes, principalmente em relação aos prematuros^{5, 6, 8, 9, 16}.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. C. Richard, do Institut Pasteur, Paris, pelo envio de cepas padrões de *F. meningosepticum*.

RIALA6/680

VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; CALZADA, C.T. & GONÇALVES, C.R. — Serological characterization of *Flavobacterium meningosepticum*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):207-211, 1989.

ABSTRACT: 22 *Flavobacterium meningosepticum* strains isolated from cerebrospinal fluid 19, blood 2, and throat 1, were serotyped by slide agglutination test using specific somatic antisera prepared according the method described by RICHARD et alii. These strains, most of them isolated from newborn, were classified into 6 serotypes, and among them the serotype C was the predominant one followed by F, B, D, H and O serotypes. Neonatal meningitis in despite of its rare occurrence, it is a severe infection with a high mortality rate and serious neurological sequelae; the characterization of the strains, isolated from epidemics reported in various countries, has been carried out by determination of the serotype, epidemiologic marker in *Flavobacterium meningosepticum*.

DESCRIPTORS: *Flavobacterium meningosepticum*, serotypes, neonatal meningitis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTMANN, G & BOGOKOVSKY, B. — In vitro sensitivity of *Flavobacterium meningosepticum* to antimicrobial agents. *J. med. Microbiol.*, 4:296-9, 1971.
2. BERRY, W.B.; MORROW, A.G.; HARRISON, D.C.; HOCHSTEIN, H.D. & HIMMELSBACH, C.K. — *Flavobacterium septicemia* following intracardiac operations. *J. thorac. cardiovasc. Surg.*, 45 (4):476-81, 1963.
3. BOLIVAR, R. & ABRAMOVITS, W. — Cutaneous infections caused by *Flavobacterium meningosepticum*. *J. infect. Dis.*, 159(1):150-1, 1989.
4. BUTTIAUX, R. & VANDEPITTE, J. — Les *Flavobacterium* dans les méningites épidémiques des nouveaux-nés. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 98:398-404, 1960.
5. CABRERA, H.A. & DAVIS, G.H. — Epidemic meningitis of the newborn caused by flavobacteria. *Am. J. Dis. Child.*, 101:289-95, 1961.
6. CAUDURO, P.F. — Identificação de *Flavobacterium meningosepticum* em casos de meningite. *Rev. Microbiol.*, 9(1):7-10, 1978.
7. EYKENS, A.; EGGERMONT, E.; ELCKELS, R.; VANDEPITTE, J. & SPAEPEN, J. — Neonatal meningitis caused by *Flavobacterium meningosepticum*. *Helv. Paediatr. Acta*, 28:421-5, 1973.
8. HAZUKA, B.T.; DAJANI, A.S.; TALBOT, K. & KEEN, B.M. — Two outbreaks of *Flavobacterium meningosepticum* type E in a neonatal intensive care unit. *J. clin. Microbiol.*, 6:450-5, 1977.
9. HOLMES, B. — Identification and distribution of *Flavobacterium meningosepticum* in clinical material. *J. appl. Bacteriol.*, 62:29-41, 1987.
10. HOLMES, B.; OWEN, R. & McMEEKIN, T.A. — Genus *Flavobacterium*. Bergey, Harrison, Bread, Hammer and Hulton 1923, 97^{AL}. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore William & Wilkins, 1984. v.1, p. 353-361.
11. KING, E.O. — Studies on a group of previously unclassified bacteria associated with meningitis in infants. *Amer. J. clin. Pathol.*, 31:241-7, 1959.
12. LAPAGE, S.P. & OWEN, R.J. — *Flavobacterium meningosepticum* from cases of meningitis in Botswana and England. *J. clin. Pathol.*, 26:747-9, 1973.
13. MADERAZO, E.G.; BASSARIS, H.P. & QUINTILLANI, R. — *Flavobacterium meningosepticum* meningitis in a newborn infant—treatment with intraventricular erythromycin. *J. Pediatr.*, 85:675-6, 1974.
14. MADRUGA, M.; ZANON, V.; PEREIRA, G.M.N. & GALVÃO, A.C. — Meningitis caused by *Flavobacterium meningosepticum*. The first epidemic outbreak of meningitis in the newborn in South America. *J. infect. Dis.*, 121:328-30, 1970.
15. MANI, R.M.; KURUVILA, K.C.; BATWALA, P.M.; DANILE, P.N.; SHIRGAONKAR, G.V.; SONI, R.P. & VYAS, P.R. — *Flavobacterium meningosepticum* as an opportunist. *J. clin. Pathol.*, 21:220-2, 1978.
16. OLSEN, H. — *Flavobacterium meningosepticum* a bacteriological, epidemiological and clinical study. *Dan. med. Bull.*, 17:171-2, 1970.
17. OLSEN, H.; FUDERIKSEN, W.C. & SIBONI, K.E. — *Flavobacterium meningosepticum* in 8 non-fatal cases of postoperative bacteriemia. *Lancet*, 1294-6, 1965.
18. PLOTKIN, S.A. & McKITTRICK, J.C. — Nosocomial meningitis of the newborn caused by a *Flavobacterium*. *JAMA*, 198:662-4, 1966.
19. RICHARD, C.; MONTEIL, H.; LAURENT, B. — Individualisation de six nouveaux types antigeniques de *Flavobacterium meningosepticum*. *Ann. Microbiol.*, 130B:141-4, 1979.
20. SHULMAN, B.H. & JOHNSON, M.S. — A case of meningitis in a premature infants due to a proteolytic Gram-negative bacillus. *J. Lab. & clin. med.*, 29:500-7, 1944.

21. SOLÉ-VERNIN, C.; ULSON, C.M. & ZUCCOLATO, M. — Verificação de *Flavobacterium meningosepticum* King, 1959, em São Paulo (Brasil), *Rev. Inst. Med. trop.*, 2(1):54-8, 1960.
22. SUGATHADASA, A.A. & ARSECULERATNE, S.N. — Neonatal meningitis caused by new serotype of *Flavobacterium meningosepticum*. *Br. med. J.*, 1:37-8, 1963.
23. TERES, D. — ICV-acquired pneumonia due to *Flavobacterium meningosepticum*. *JAMA*, 228:732, 1974.
24. THONG, M.L.; PUTHUCHEARY, S.D. & LEE, E.L. — *Flavobacterium meningosepticum* infection: an epidemiological study in a newborn nursery. *J. clin. Pathol.*, 34:429-33, 198.
23. TERES, D. — ICV-acquired pneumonia due to *Flavobacterium meningosepticum*. *JAMA*, 228:732, 1974.

Recebido para publicação em 17 de agosto de 1989.

AValiação DA RELAÇÃO UMIDADE/PROTEÍNA EM SALSICHAS, COM PROTEÍNA TEXTURIZADA DE SOJA, ANTES E APÓS O ENLATAMENTO*

Mário TAVARES**
Cássia Maria LOBANCO**
José Byron de CARVALHO**
Márcia Regina PENNACINO-AMARAL MELLO**
Thereza Yalue ANRAKU**
Sérgio Roberto BOTTEZELLI***

RIALA6/681

TAVARES, M.; LOBANCO, C.M.; CARVALHO, J.B.; PENNACINO-AMARAL MELLO, M.R.; ANRAKU, T.Y. & BOTTEZELLI, S.R. — Avaliação da relação umidade/proteína em salsichas, com proteína texturizada de soja, antes e após o enlatamento. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):213-218, 1989.

RESUMO: A água adicionada na fabricação de produtos emulsionados, como a salsicha, é tecnologicamente necessária, mas se for em excesso compromete o valor nutritivo do produto e deixa de atender à legislação brasileira, que desde 1962 fixa a relação umidade/proteína (U/P) em 3,50: 1,00, antes do enlatamento. Considerando que, a partir de 1978, foi permitida a adição de proteína texturizada de soja (PTS) em produtos cárneos, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar tal relação em amostras de salsicha, com os seguintes teores de PTS: zero 9,0, 15,0 e 22,5%, em base hidratada, antes e após o enlatamento, num período de 150 dias. Os resultados mostraram que a relação U/P variou de 3,57 a 5,32; 3,80 a 5,87; 3,78 a 5,98 e 3,85 a 5,77, respectivamente, para cada formulação, alcançando relativo equilíbrio após 15 dias de enlatamento. Concluindo, os autores propõem a alteração do valor da relação U/P, antes do enlatamento de 3,50: 1,00 para 4,00:1,00, e para o embutido enlatado, valores entre 5,00:1,00 e 6,00:1,00.

DESCRITORES: Salsicha enlatada, proteína texturizada de soja; salsicha enlatada, relação umidade/proteína; salsicha enlatada, legislação.

INTRODUÇÃO

A salsicha é um produto cárneo, tipo emulsão, constituído basicamente de proteína, água e gordura^{6,7,18}. Legalmente, é definida como "o produto preparado com carnes, toucinho e condimentos, perfeitamente triturados e misturados, embutido em tripas finas de suínos novos, de ovinos e caprinos ou em plásticos apropriados, cozido e ligeiramente defumado ou não"^{15,17}.

A quantidade de água adicionada na fabricação

de produtos emulsionados, como a salsicha, é um dos pontos críticos do processamento, já que influi diretamente na relação umidade/proteína (U/P) do produto acabado, antes de ser enlatado^{4,5,6}. A adição de água é tecnologicamente necessária porque confere maior estabilidade à emulsão — o gel formado com a proteína muscular — e compensa perdas durante o cozimento, resultando num produto de melhores características sensoriais^{5,12}.

A legislação vigente no Brasil¹, a exemplo da

* Realizado na Seção de óleos, Gorduras e Condimentos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, e no Centro de Tecnologia da Carne do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, SP. Apresentado no 12º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, 1989.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Instituto de Tecnologia de Alimentos.

norte-americana⁹, permite a adição máxima de 10% de água ou gelo, no caso de embutidos cozidos (salsichas tipo Viena, Frankfurt e outras), não fazendo referência quando o embutido é enlatado^{1,18}. Fixa, ainda, para o produto final, antes do enlatamento, a relação água/proteína igual a 3,50:1,00 (fator 6,25) — nos Estados Unidos, 4,00:1,00⁹ —, certamente para cobrir possíveis fraudes contra o consumidor, visto que um excesso de água proporciona ao fabricante uma redução na quantidade de carne e, conseqüentemente, nos custos do processo¹².

Se os inspetores federais, por sua vez, não analisarem as salsichas antes do enlatamento, nas indústrias, torna-se quase impossível avaliar a relação U/P e descobrir fraudes, já que as salsichas enlatadas absorvem, por osmose^{13,14} água oriunda da salmoura de enchimento das latas^{4,5}. Tentando contornar o problema, MUCCILO & GOMES^{12,13} propuseram uma equação matemática, em que aquela relação é função do tempo de enlatamento, permitindo saber se a mesma atendia às normas legais antes de salsicha ser enlatada. No entanto, os próprios autores desaconselharam a aplicação de equação por períodos de tempo de enlatamento superiores a 69 dias¹².

Vários trabalhos foram publicados, avaliando a relação U/P de salsichas enlatadas^{4,5,6,11,12,13,14,18}, porém nenhum deles levou em consideração legal, desde 1978², do emprego de até 7,5% em base seca ou 22,5% em base hidratada, de proteína texturizada de soja (PTS), em produtos cárneos, calculados sobre o total da massa do produto final, e sua possível influência na tal relação. Ressalte-se que GOMIDE et alii⁵ e MUCCILO & GOMES¹² empregaram proteína isolada de soja e PTS, respectivamente, nas formulações de salsichas, sem contudo focar sua aludida influência sobre a relação U/P. A propósito, cabe destacar que as proteínas de soja apresentam uma série de vantagens nutricionais, organolépticas e econômicas, que favorecem o seu uso em alimentos¹⁰. A PTS, no caso, é utilizada como ingrediente de alimentos como fonte protéica e "extensor" em produtos de carne¹⁷ e contribui para a estabilização da emulsão⁴, apresentando, entre outras vantagens, textura igual à da carne³.

Considerando, então, a permissão do emprego de PTS em produtos cárneos e a não publicação de trabalhos levando em conta a sua influência sobre a relação U/P de salsichas enlatadas, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar esta relação em amostras de salsichas, antes do enlatamento e até 150 dias após esta operação a partir de quatro formulações conhecidas, três das quais contendo proteína texturizada de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

A elaboração e o enlatamento das salsichas foram realizados no Centro de Tecnologia da Carne do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), em Campinas, SP, enquanto as análises físicas e químicas foram efetuadas na Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, SP, no período de abril de 1987 a julho de 1989.

Para o presente experimento, definiram-se quatro formulações de salsichas, em que variou o teor de proteína texturizada de soja (PTS), a saber: zero; 9,0; 15,0 e 22,5%, em base hidratada. Em conseqüência, variaram também os teores de carne bovina e suína. Na formulação sem PTS, empregaram-se 50,87% de carne bovina e 21,9% de carne suína; com 9,0% de PTS, 43,87% e 19,19%; com 15,0% de PTS, 40,87% e 16,19%, e com 22,5% de PTS, 38,37% e 11,19%, respectivamente. A formulação básica para os ensaios é apresentada na tabela 1.

O processo empregado na elaboração das salsichas foi similar ao utilizado rotineiramente pelas indústrias¹⁶, constituído das seguintes etapas a) emulsão, usando moedor e "cutter" convencional; b) embutimento em tripa artificial; c) tratamento térmico em estufa até a temperatura externa de 70°C; d) resfriamento até 35-40°C, descascamento e enlatamento; e) recravação a vácuo. As salsichas obtidas foram acondicionadas em latas sanitárias de 72 x 80 mm, colocando-se nove gomos em cada lata, transportadas para o laboratório e armazenadas à temperatura ambiente até o procedimento das análises.

As determinações de umidade e proteína obe-

TABELA 1

Formulação básica de salsichas, sem proteína texturizada de soja

Ingredientes	Peso(kg)	%
Carne bovina (dianteiro)	60,00	50,87
Carne suína	25,00	21,19
Toucinho	15,00	12,72
Sal refinado	4,48	3,80
Amido de milho	2,35	1,99
Açúcar	0,87	0,74
Pimenta branca moída	0,18	0,15
Noz-moscada moída	0,14	0,12
Coentro	0,12	0,10
Fumaça líquida "Tumarín"	0,07	0,06
Eritorbato de sódio	0,07	0,06
Nitrito de sódio	0,01	0,01
Gelo	9,66	8,19
Total	117,95	100,00

TABELA 2

Médias da relação umidade/proteína de salsichas enlatadas, sem proteína texturizada de soja e com 9,0% de PTS, em base hidratada

Tempo de abertura da lata	sem PTS			com 9% PTS		
	Umidade %	Proteína %	Relação U/P	Umidade %	Proteína %	Relação U/P
antes do enlatamento	57,51	16,09	3,57	57,71	15,19	3,80
5 min.	61,74	13,06	4,72	61,94	14,18	4,37
10 min.	62,31	13,16	4,73	62,21	14,14	4,40
20 min.	62,21	12,95	4,80	62,20	13,83	4,53
30 min.	61,97	12,96	4,78	62,78	13,73	4,57
1 h.	61,89	12,92	4,79	63,01	13,62	4,62
2 h.	62,60	12,98	4,82	63,36	13,51	4,69
4 h.	62,68	12,84	4,88	64,18	13,69	4,68
8 h.	63,18	12,66	4,99	65,03	13,47	4,82
16 h.	63,89	12,55	5,09	65,39	13,21	4,95
24 h.	63,87	12,45	5,13	66,17	12,51	5,29
2 dias	66,56	13,01	5,12	66,22	11,95	5,54
7 dias	66,84	12,78	5,23	67,90	11,81	5,75
15 dias	67,35	12,85	5,24	67,41	11,72	5,75
21 dias	67,36	12,82	5,24	67,27	11,62	5,79
30 dias	67,16	12,95	5,19	67,45	11,79	5,72
45 dias	67,58	12,72	5,31	67,71	11,67	5,80
60 dias	67,40	12,93	5,21	67,22	11,52	5,84
75 dias	67,45	12,90	5,23	67,36	11,57	5,82
90 dias	67,49	12,93	5,22	67,37	11,77	5,72
105 dias	67,25	12,87	5,23	66,95	11,49	5,82
120 dias	67,50	12,97	5,20	67,49	11,69	5,77
135 dias	67,48	12,78	5,28	68,33	11,59	5,89
150 dias	67,53	12,69	5,32	67,07	11,43	5,87

Notas: As análises foram feitas em duplicata (proteína: fator 6,25).

TABELA 3

Médias da relação umidade/proteína de salsichas enlatadas, contendo 15,0 e 22,5% de proteína texturizada de soja, em base hidratada

Tempo de abertura da lata	com 15% PTS			com 22,5% PTS		
	Umidade %	Proteína %	Relação U/P	Umidade %	Proteína %	Relação U/P
antes do enlatamento	57,07	15,08	3,78	59,93	15,61	3,84
5 min.	62,30	14,96	4,16	62,32	15,20	4,10
10 min.	62,68	14,81	4,23	62,56	15,34	4,08
20 min.	62,80	14,72	4,27	62,51	14,86	4,21
30 min.	62,83	14,50	4,33	62,56	14,84	4,22
1 h.	62,51	14,37	4,35	62,76	14,45	4,34
2 h.	63,41	14,25	4,45	63,68	14,67	4,34
4 h.	63,46	14,12	4,49	64,11	14,34	4,47
8 h.	64,65	13,80	4,68	64,44	14,48	4,45
16 h.	65,36	13,65	4,79	64,50	14,04	4,59
24 h.	66,83	12,74	5,24	65,08	14,19	5,59
2 dias	67,26	12,71	5,29	67,72	13,53	5,01
7 dias	68,35	12,21	5,59	68,72	13,41	5,12
15 dias	68,78	11,66	5,90	68,62	12,78	5,37
21 dias	68,44	11,53	5,93	69,30	12,64	5,48
30 dias	68,59	11,65	5,89	69,04	12,62	5,47
45 dias	68,52	11,60	5,91	69,23	12,70	5,45
60 dias	68,64	11,64	5,89	69,61	12,62	5,52
75 dias	68,35	11,76	5,81	69,55	12,63	5,51
90 dias	68,94	11,65	5,92	69,01	12,45	5,54
105 dias	68,31	11,74	5,82	69,17	12,50	5,53
120 dias	68,77	11,60	5,93	69,37	12,45	5,57
135 dias	68,79	11,58	5,94	69,17	12,30	5,62
150 dias	69,46	11,61	5,98	69,36	12,01	5,77

Notas: As análises foram feitas em duplicata (proteína: fator 6,25).

deceram aos métodos descritos nas "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"⁸, ou seja, aquecimento em estufa a 105°C até peso constante, e digestão do material com ácido sulfúrico e destilação de amônia formada ("macro-Kjeldahl"), respectivamente. Essas determinações ocorreram antes do enlatamento e durante um período máximo de 150 dias decorridos do mesmo, ou seja: 5, 10, 20 e 30 minutos; 1, 2, 4, 8, 16 e 24 horas; 2, 7, 15, 21, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150 dias.

O preparo das amostras a serem submetidas às análises foi conduzido mediante a separação das salsichas da água de enchimento das latas, por drenagem, depois enxugadas em papel de filtro e trituradas em multiprocessador doméstico, para obter-se uma pasta homogênea.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelas tabelas 2 e 3 verifica-se que a relação U/P variou de 3,57 a 5,32; 3,80 a 5,87; 3,78 a 5,98 e 3,84 a 5,77, respectivamente, para as formulações contendo zero, 9,0%, 15,0% e 22,5%, em base hidratada, de proteína texturizada de soja. Um relativo equilíbrio foi alcançado em torno do 15º dia de processamento; já MUCCIOLO et alii¹⁴, analisando 40 amostras de salsichas enlatadas, adquiridas no mercado, obtiveram a estabilização após o 8º dia, o que de certa forma se aproxima daquela constatação.

Os resultados ora encontrados vieram a endossar a crítica feita por outros autores^{4,5,12,13,14,18}, de que a relação UP de 3,50: 1,00, exigida pela legislação brasileira, é inviável e irreal do ponto de vista tecnológico, independente do fato de não terem examinado salsichas contendo PTS. É que a adição de PTS, dentro dos limites legais, praticamente não altera a relação U/P, ao contrário do que se poderia imaginar, embora uma absorção de umidade possa ser notada, diretamente proporcional ao aumento de PTS na formulação. Entretanto, como a PTS possui um teor mínimo de 50,0% de proteína, na base seca, e

apenas 8,0% de umidade máxima¹⁷, esta relação é, na prática, mantida.

CONCLUSÕES

1. As trocas osmóticas entre a salsicha e a água de enlatamento se estabeleceram com maior intensidade nos primeiros dias de processamento, atingindo relativo equilíbrio em torno do 15º dia.

2. Os valores da relação umidade/proteína de todas as salsichas analisadas estiveram entre 3,57:1,00 e 5,98: 1,00, correspondendo, respectivamente, às formulações sem proteína texturizada de soja, em período anterior ao enlatamento, e com 15,0% de PTS, em base hidratada, depois do enlatamento.

3. Faz-se necessária uma revisão na relação U/P, antes do enlatamento das salsichas, da legislação vigente no Brasil, por ser a mesma inviável tecnologicamente, propondo-se sua alteração para 4,00: 1,00, levando em consideração inclusive a adição de água ou gelo, bem como de proteína texturizada de soja, permitidos no caso de embutidos cozidos.

4. Como a equação proposta por MUCCIOLO & GOMES para calcular o valor da relação U/P, antes do enlatamento das salsichas, só pode ser aplicada com segurança para tempos de enlatamento inferiores a 69 dias, seria importante a fixação daquela relação também para a salsicha enlatada — o produto efetivamente comercializado —, sugerindo os autores valores entre 5,00: 1,00 e 6,00: 1,00, visto que esta faixa engloba não apenas curtos e longos períodos de enlatamento, inclusive onde se alcança o equilíbrio, bem como o limite de vida-de-prateleira do produto.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro a este trabalho.

RIALA6/681

TAVARES, M.; LOBANCO, C.M.; CARVALHO, J.B.; PENNACINO-AMARAL MELLO, M.R.; ANRAKU, T.Y. & BOTTEZELLI, S.R. — Evaluation of moisture/protein ratio in sausage (*hot dog*), with soybean texturized protein, before and after canning. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):213-218, 1989.

ABSTRACT: The water addition in the manufacture of emulsified products, as the sausage (*hot dog*), is technologically necessary, but if in excess compromises the nutritive value of the product, besides it miss to attend the Brazilian legislation, which since 1962 fixes the moisture/protein ratio (M/P) in 3,50: 1,00; before canning. Considering the fact that since 1978 it was permitted the addition of soybean texturized protein (STP) in meat products, the present work had as principal objective to evaluate the ratio M/P in sausage samples, with the following contents of STP: zero, 9,0, 15,0 and 22,5%, in hydrated basis, before and after canning during 150 days. The results showed that the M/P ratio varied from 3,57 to 5,32; 3,80 to 5,87; 3,78 to 5,98 and 3,85 to 5,77, respectively, for each formulation, reaching the relative equilibrium after 15 days canning. Concluding, the authors propose the alteration for the M/P ratio value, before canning, from 3,50:1,00 to 4,00: 1,00, and for canned inlaid, values between 5,00 and 6,00: 1,00.

DESCRIPTORS: canned sausage (*hot dog*), soybean texturized protein; canned sausage (*hot dog*), moisture/protein ratio; canned (*hot dog*), legislation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Leis, decretos etc. — Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto nº 1.255 de 25 de junho de 1962. Aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, Brasília, Ministério da Agricultura, 1980, p. 67.
- BRASIL. Leis, decretos etc. — Portaria nº 115/78, da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. *Diário Oficial*, Brasília, 1º ago. 1978. Seq. I, pt. 1, p. 12020-1. Permite o emprego de proteína texturizada de soja em produtos cárneos.
- COSTA, S.I. & MORI, E.E.M. — Principais formas de aproveitamento da soja na alimentação humana. *Bol. Inst. Tecnol. Aliment.* 56: 27-49, 1978.
- GOMIDE, L.A.M.; PEREIRA, A. S. & GOMES, J.C. — Avaliação físico-química de salsichas Vienna enlatadas. *Alimentação*, 76: 22-9, 1985.
- GOMIDE, L.A.M.; PEREIRA, A.S. & GOMES, J.C. — Efeito da relação umidade: proteína sobre a estabilidade da emulsão de salsichas enlatadas. *Bol. SBCTA*, 21(3/4): 170-8, 1987.
- GRANER, M. - Processamento e conservação de produtos de origem animal - carnes vermelhas e produtos avícolas. In: CAMARGO, R. et alii. *Tecnologia dos produtos agropecuários — alimentos*. São Paulo, Nobel, 1984, cap. 9, p.137-64.
- HSU, L.A.; CIAMPI, C.M.S.; DELAZARI, I.; LAZARINE, V.B.; GALVÃO, L.C.A. & FIGUEIREDO, I.B. - Avaliação de qualidade de salsichas. *Bol. Inst. Tecnol. Aliment.*, 53: 93-107, 1977.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo) — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3ª ed. São Paulo, IMESP, 1985. v. 1, p.21-45.
- LAUCK, R.M. — The functionality of binders in meat emulsions. *J. Food. Sci.*, 40: 736-40, 1975.
- MANJARREZ, S.D. - Usos de la proteína de soya en carnes (2ª parte). *Soya Noticias*, 201: 3-4, 1987.
- MORI, E.E.M.; HSU, L.; DELAZARI, I.; FIGUIEREDO, I.B.; ANGELUCCI, E.; SHIROSE, I. & CALLIL, R.M. — Qualidade de salsichas provenientes de cinco fabricantes de São Paulo. *Bol. SBCTA*, 15(1): 25-54, 1981.
- MUCCIOLO, P. & GOMES, M.C.G. — A relação umidade/proteína (U/P) na repressão de fraude de salsichas enlatadas. *Bol. SBCTA*, 15(4): 379-93, 1981.
- MUCCIOLO, P. & GOMES, M.C.G. — Relação umidade/proteína de salsichas enlatadas: uma equação para calcular seu valor antes do enlatamento. *Hig. Aliment.* 1(3/4): 216-7, 1982.
- MUCCIOLO, P.; MEIRA, D.R. & GOMES, M.C.G. - Relação umidade/proteína de salsichas enlatadas e seu comportamento em função do tempo de processamento. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40(2): 129-34, 1980.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. - *Normas sanitárias de alimentos*. Washington, 1967. (Serviços Médicos Veterinários, Higiene de Alimentos, Série N° 1, Tomo I).
- RODRIGUES, F.A. - Tecnologia dos produtos cárneos. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos: Centro de Tecnologia da Carne. 1978. p.99-103.
- SÃO PAULO. Leis, decretos etc. — Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p.1 (NTA 36) Aprova as Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.
- TAKINO, M.; KOMATSU, I. & GALLI, F. - Relação umidade:proteína de salsichas e mortadelas consumidas em São Paulo. *Atualid. vet.*, 3(19): 4-10, 1974.

Recebido para publicação em 18 de agosto de 1989.

EPIDEMIOLOGIA DA MENINGITE POR *HAEMOPHILUS*
INFLUENZAE, NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO, 1960-77*

José Cassio de MORAES**
José da Silva GUEDES***

RIALA6/682

MORAES, J. C. & GUEDES, J. S. — Epidemiologia da meningite por *Haemophilus influenzae*, no município de São Paulo, 1960-77. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2): 219-229, 1989.

RESUMO: O presente estudo analisa o comportamento epidemiológico da meningite por *H. influenzae*, no município de São Paulo, no período 1960-77. O levantamento foi realizado diretamente do prontuário dos pacientes por uma equipe formada por professores do Departamento de Medicina Social da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, por médicos sanitaristas e por acadêmicos de medicina. A meningite por *H. influenzae* somente foi confirmada quando se identificou o agente na cultura. No período estudado foram confirmados 900 casos de meningite por *H. influenzae* com um coeficiente médio de 0,89 por 100.000 habitantes. Os menores de 5 anos contribuíram com 91,2% dos casos, dos quais 63% eram em menores de um ano. O coeficiente médio para menores de um ano foi de 23,3 por 100.000 habitantes. As zonas central, intermediária e periférica da cidade não apresentaram incidências significativamente diferentes. Os coeficientes de morbidade padronizados segundo idade foram 0,8, 0,8 e 0,9 para as zonas central, intermediária e periférica, respectivamente. A letalidade média no período de 1960-77 foi de 31%. As crianças menores de um ano apresentaram a maior taxa de letalidade, 40%.

DESCRITORES: meningites bacterianas; meningites causadas por *Haemophilus influenzae*; epidemiologia do *Haemophilus influenzae*.

INTRODUÇÃO

As meningites bacterianas constituem um sério problema de Saúde Pública em todo mundo por sua incidência, sua letalidade e pela frequência das seqüelas que os sobreviventes apresentam. Os agentes etiológicos *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae* são responsáveis, na maioria dos países, por cerca de 60 a 80% dos casos de meningite bacteriana^{4,8,9,10,12,13,14,15,17,21,22,25,48}.

O *H. influenzae* (Hi) foi isolado pela primeira vez por PFEIFER em 1892-3 sendo reconhecido por SLAW como um dos agentes etiológicos da meningite bacteriana⁴⁰.

As meningites por Hi são, geralmente, ocasionadas pelo seu sorotipo b³⁹. Este provavelmente deve ser mais invasivo, mais patogênico e/ou menos detectado pelas defesas do hospedeiro¹⁹. A patogenicidade do Hi é atribuída basicamente à configuração antigênica da cápsula, essencialmente um composto de polirribosil-ribitol fosfato (PRP).

O diagnóstico presuntivo é feito pelo encontro de bacilos Gram negativo pleomórficos no líquido cefalorraquidiano e confirmado por cultura e/ou contraímunoeletroforese^{30,45}. A presença de antibiótico no líquido, indicador do uso de antibióticos previamente à colheita, não afeta os resultados da bacterioscopia e da contraímunoeletroforese, mas altera o resultado da cultura que se

* Esta publicação é parte da tese de doutorado do primeiro autor³³.

** Professor Assistente do Departamento de Medicina Social da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, SP, Paulo, SP.

*** Professor Pleno do Departamento de Medicina Social da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, SP.

torna 1,74 vezes menos positiva³⁰. Esta interferência é menos intensa que a encontrada nas meningites por pneumococo e meningococo por ser o Hi mais resistente às drogas comumente utilizadas no tratamento das meningites bacterianas³⁰.

A meningite por Hi é mais freqüente na faixa etária de 3 meses a 5 anos. O recém-nascido possui geralmente anticorpos contra o *H. influenzae* tipo b (Hib), conferindo-lhe uma resistência passiva natural à doença⁴¹. A maior parte dos adultos e das crianças acima de 6 anos também possuem anticorpos séricos apesar de a doença ser pouco freqüente e de haver uma baixa taxa de portadores. Uma possível explicação seria o estímulo antigênico dado por reações cruzadas com a flora intestinal normal como, por exemplo, com *E. coli*³⁷.

O município de São Paulo sofreu no período 1971-1977 epidemias de meningite meningocócica pelos sorogrupos A e C com coeficientes de incidência bastante elevados que atingiram em 1974, acme da epidemia, um valor de 181 por 100.000 habitantes, com 12.388 casos e 891 óbitos³².

Com o objetivo de acompanhar a evolução da epidemia, formou-se uma equipe composta por técnicos da Secretaria de Estado da Saúde e do Departamento de Medicina Social da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, que levantou os casos suspeitos de meningite bacteriana hospitalizados no período de 1960-77. Este levantamento forneceu uma série de informações importantes para o conhecimento da epidemiologia das meningites em geral. Analisaremos, no presente trabalho, o comportamento epidemiológico da meningite por Hi. Estudaremos a distribuição dos casos segundo tendência secular, idade, sexo e local de residência.

O estudo se limitará aos casos ocorridos no período de 1960 a 1977, residentes no município de São Paulo, analisando a morbidade e a letalidade em relação ao tempo, às pessoas e ao espaço.

MATERIAL E MÉTODOS

Tendo em vista a gravidade da doença, os pacientes com quadro suspeito de meningite bacteriana quase sempre são internados. O Hospital Emílio Ribas, até 1973, era praticamente o único a internar pacientes suspeitos de meningite no município de São Paulo. MORAIS *et alii*³⁴ estimaram, por meio de um levantamento realizado em junho de 1972 junto a laboratórios, que 90% dos pacientes com meningites eram internados no Hospital Emílio Ribas.

As informações disponíveis, no período de 1960 a 1973, podem ser consideradas boas, tanto do ponto de vista quantitativo quanto do da consis-

tência dos critérios de confirmação de casos, pois ambos dependem basicamente daquele hospital.

A partir de 1974, entretanto, com o aumento dos casos de doença meningocócica, tornou-se necessária a utilização de uma enorme rede hospitalar para atender aos casos suspeitos de meningite. No mês de setembro daquele ano, por exemplo, existiam 2.500 pacientes internados, distribuídos em 28 hospitais públicos e privados.

A ampliação do número de hospitais que internavam doentes de meningite exigiu que se adotassem critérios padronizados de confirmação dos casos, garantindo assim a comparabilidade dos dados com os do Hospital Emílio Ribas.

Uma equipe já mencionada colheu, diretamente dos prontuários de pacientes internados nos 28 hospitais, as informações necessárias para o preenchimento de uma ficha pré-codificada.

No presente trabalho, a meningite por Hi foi confirmada exclusivamente quando o agente era identificado na cultura.

A partir do endereço registrado no prontuário do paciente, classificou-se o local de residência em subdistritos e distritos por meio de consulta a um mapa atualizado do município de São Paulo. Os subdistritos do Distrito de São Paulo e os outros distritos que compõem o município de São Paulo foram agrupados em 3 áreas homogêneas (zonas), de acordo com a metodologia proposta pela Fundação Seade⁴¹ (SEADE, 1977). O quadro 1 mostra a distribuição dos subdistritos e distritos do município de São Paulo. Segundo CARVALHEIRO⁶, na zona central se concentraria a burguesia, na zona intermediária o proletariado e finalmente, na zona periférica, o subproletariado.

A população dos subdistritos e distritos do município de São Paulo para os anos compreendidos no estudo, 1960-77, foi estimada pelo método geométrico modificado, proposto por CAMEL⁵. As faixas etárias consideradas foram: menores de 1 ano, 1 a 4, 5 a 9, 10 a 14, 15 a 19, 20 a 29, 30 a 39, 40 a 49, 50 a 59, 60 a 69 e 70 anos e mais. A população não foi subdividida por sexo porque o IBGE não publicou a população por idade e sexo para o município de São Paulo para o ano censitário de 1970.

Para a análise estatística dos resultados, utilizaram-se os testes do qui-quadrado¹, e para testar a sazonalidade o de KOLMOGOROV¹⁶.

RESULTADOS

No período de 1960 a 1977 foram confirma-

dos 900 casos de meningite por Hi em residentes no município de São Paulo. O coeficiente de morbidade por 100.000 habitantes variou de 1,45 a 0,28 para os anos de 1964 e 1974, respectivamente (tabela 1). Na primeira década a doença se manteve praticamente constante, apresentando uma relação de 1,63 entre a maior e a menor incidência. No período seguinte, esta relação foi bem maior^{4,36}.

TABELA 1

Meningite por H. influenzae segundo ano. Município de São Paulo, 1960-77. Coef. por 100.000 habitantes

Ano	Casos	Coef.
1960	51	1,22
1961	43	0,99
1962	51	1,13
1963	44	0,95
1964	70	1,45
1965	47	0,94
1966	63	1,22
1967	50	0,93
1968	53	0,96
1969	51	0,89
1970	27	0,45
1971	44	0,71
1972	72	1,13
1973	46	0,70
1974	19	0,28
1975	36	0,51
1976	40	0,54
1977	93	3,22

O menor coeficiente foi verificado no ano de 1974, ápice da epidemia de meningite meningocócica no município de São Paulo.

A distribuição sazonal da meningite bacteriana por Hi para os anos de 1960-77 pode ser apreciada no gráfico 1.

Os meses de maio a agosto apresentaram uma diferença significativa no número de casos. A distribuição sazonal foi semelhante nos períodos de 1960-69 e 1970-77.

A distribuição etária dos casos de meningite por Hi é mostrada na tabela 2.

Os menores de 5 anos contribuíram com 91,2% dos casos e quase dois terços ocorreram em menores de 1 ano. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na distribuição etária nos dois períodos, 1960-69 e 1970-77 ($X^2 = 9,7$ $P > 0,05$).

A proporção de casos em menores de um ano variou entre 44,4% e 70,6% para os anos de 1970 e 1960, respectivamente.

O grupo etário de maior risco de adoecer de

TABELA 2

Meningite por H. influenzae segundo faixa etária e período. Município de São Paulo, 1960-77. Distribuição percentual

Idade (em anos)	1960 - 1969		1970 - 1977		1960 - 1977	
	Casos	%	Casos	%	Casos	%
Menor de 1	320	61,2	197	52,3	517	57,4
1 a 4	161	30,8	143	37,9	304	33,8
5 a 9	21	4,0	12	3,2	33	3,7
10 a 14	8	1,5	8	2,1	16	1,8
15 a 59	13	2,5	14	3,7	27	3,0
60 e mais	0	—	1	0,3	1	0,1
Ignorado	0	—	2	0,5	2	0,2
Total	523	100,0	377	100,0	900	100,0

meningite por Hi foi o de menores de 1 ano. Em seguida temos o de 1 a 4 anos. Os demais grupos apresentaram uma incidência bem menor com valores próximos a zero. O coeficiente por 100.000 habitantes para o grupo etário menor de 1 ano variou entre 7,99 e 44,67 em 1974 e em 1960, respectivamente.

A idade média dos casos foi de 28 meses, com um desvio padrão de 70 meses e uma mediana de 10 meses.

No primeiro ano de vida da criança somente 7% dos casos ocorreram no primeiro trimestre. O valor mediano foi de 7 meses (tabela 3).

TABELA 3

Meningite por H. influenzae, menores de um ano, segundo idade em meses. Município de São Paulo, 1960-77. Distribuição percentual

Idade (em meses)	Casos	%	% Acumulada
Menor de 1	13	2,5	2,5
1	10	1,9	4,4
2	13	2,5	7,0
3	23	4,4	11,4
4	40	7,7	19,1
5	71	13,7	32,9
6	73	14,1	47,0
7	68	13,2	60,2
8	86	16,6	76,8
9	46	8,9	85,7
10	40	7,7	93,4
11	34	6,6	100,0
Total	517	100,0	

A morbidade por zona de residência dos casos de meningite por Hi no período de 1960 a 1977 é mostrada na tabela 4. A zona periférica tem um coeficiente médio 2,1 vezes maior que o das demais zonas, mas a diferença não é significativa ($X^2 = 3,7$ e $P > 0,05$).

A distribuição etária apresentou uma diferença significativa entre as zonas ($X^2 = 18,9$ $P < 0,05$). Esta diferença não foi observada, entretanto, entre as faixas etárias de maior risco, menores de 1 ano e 1 a 4 anos ($X^2 = 2,5$ $P > 0,05$) (tabela 5).

As zonas central e periférica têm mais de 90% dos casos em menores de 5 anos, enquanto na zona intermediária esta proporção cai para 86,3%.

TABELA 4

Meningite por H. influenzae segundo zona de residência. Município de São Paulo, 1960-77. Coef. médio por 100.000 habitantes.

Zona	Casos	Coef.
Central	76	0,51
Intermediária	166	0,63
Periférica	649	1,06
Ignorada	9	—
São Paulo	900	0,89

Como os riscos por faixa etária não são homogêneos, as diferenças encontradas poderiam ser devidas às distintas composições etárias das zonas central, intermediária e periférica. Assim, a zona central tinha, em 1968, 6% de sua população com menos de 5 anos, enquanto na zona periférica essa taxa era de 13%.

Desta forma, resolvemos padronizar o coeficiente médio de morbidade pelo método direto²⁷, usando como população padrão a média aritmética das populações estimadas para o município de São Paulo nos anos 1968 e 1969.

Os coeficientes calculados da forma descrita foram 0,79, 0,81 e 0,90 para as zonas central, intermediária e periférica, respectivamente. Os coeficientes padronizados por zona são próximos, passando a zona periférica ser somente 1,1 vezes maior que a zona central.

A tabela 6 mostra a letalidade da meningite por Hi segundo o ano. A letalidade média do período foi de 31,3% com valores extremos de 51,0 e 9,7% para os anos de 1960 e 1977, respectivamente.

A evolução da letalidade nos mostra dois momentos distintos. Um, com letalidade mais elevada e que durou de 1960 a 1972, e outro, com valores mais baixos no período de 1973 a 1976.

A tabela 7 mostra a letalidade segundo idade. As crianças menores de 1 ano apresentaram a maior taxa de letalidade, 40,0%, enquanto na faixa etária de 10 a 14 anos encontramos a menor letalidade, 17,8%.

TABELA 5

Meningite por H. influenzae segundo faixa etária e zona de residência. Município de São Paulo, 1960-77. Coef. médio por 100.000 habitantes

Idade (Anos)	Zona										
	Central			Intermediária			Periférica			Ignorados	
	Casos	%	Coef.	Casos	%	Coef.	Casos	%	Coef.	Casos	%
Menor de 1	47	61,8	21,06	82	49,4	18,96	382	58,9	24,30	6	66,7
1 a 4	24	31,6	2,91	61	36,7	3,55	216	33,3	3,43	3	33,3
5 a 9	1	1,3	0,08	6	3,6	0,24	26	4,0	0,32	0	—
10 a 14	1	1,3	0,08	5	3,0	0,21	10	1,5	0,14	0	—
15 a 59	3	3,9	0,03	11	6,6	0,07	13	2,0	0,04	0	—
60 e mais	0	—	—	1	0,6	0,66	0	—	—	0	—
Ignorado	0	—	—	0	—	—	2	0,3	—	0	—
Total	76	100,0	0,47	166	100,0	0,48	649	100,0	1,23	9	100,0

TABELA 6

Meningite por *H. influenzae*. Letalidade segundo ano. Município de São Paulo, 1960-77

Ano	Casos	Óbitos	Letal. (%)
1960	51	26	51,0
1961	43	15	34,9
1962	51	22	43,1
1963	44	19	43,2
1964	70	19	27,1
1965	47	16	34,0
1966	63	24	38,1
1967	50	22	44,0
1968	53	24	45,3
1969	51	16	31,4
1970	27	9	33,3
1971	44	16	36,4
1972	72	22	30,6
1973	46	8	17,4
1974	19	3	15,8
1975	36	5	13,9
1976	40	7	17,5
1977	93	9	9,7
Total	900	282	31,3

TABELA 7

Meningite por *H. influenzae* letalidade segundo faixa etária e sexo. Município de São Paulo, 1960-77

Idade (anos)	Casos	Óbitos	Letal. %
Menor de 1	517	207	40,0
1 a 4	304	54	17,8
5 a 9	33	10	30,3
10 a 14	16	3	18,8
15 a 59	27	6	22,2
60 e mais	1	1	100,0
Ignorado	2	1	50,0
Total	900	282	31,3

Em 11% dos casos não foi possível obter o número de leucócitos no líquido cefalorraquidiano. Em alguns hospitais era freqüente o encontro da anotação de "incontáveis" leucócitos no resultado da quimioцитologia do líquido, situação esta que representou no caso de meningite por *Hi* 9% dos casos.

A tabela 8 mostra a letalidade de meningite por *Hi* segundo o número de leucócitos no líquido cefalorraquidiano de entrada. Os intervalos foram construídos de acordo com HODGES²².

A gravidade da doença (medida pela letalidade) foi semelhante para as três zonas ($X^2 = 1,7$ $P > 0,05$) (tabela 9).

TABELA 8

Meningite por *H. influenzae* letalidade segundo número de leucócitos por mm^3 no líquido cefalorraquidiano. Município de São Paulo, 1960-77

Leucócitos número	Casos	Óbitos	Letal. %
0-99	45	15	33,3
100-499	128	42	32,8
500-999	109	32	29,4
≥ 1000	464	126	27,2
Total	746	215	28,8

TABELA 9

Meningite por *H. influenzae* letalidade segundo zona de residência. Município de São Paulo, 1960-77

Zona	Casos	Óbitos	Letal %
central	76	26	34,2
intermediária	166	52	31,3
periférica	649	201	31,0
ignorada	9	3	33,3
Total	900	282	31,3

DISCUSSÃO

A variação apresentada da incidência da meningite (tabela 1), inclusive com uma pequena tendência de queda, não está de acordo com os dados da literatura internacional.

FRASER¹⁴, estudando a incidência de meningites bacterianas em Olmsted County, Minnesota, Estados Unidos da América, no período de 1935 a 1970, constatou um aumento da incidência, que passou de 1,4 a 4,3 por 100.000 habitantes.

SMITH⁴⁴ verificou um aumento de 400% nas internações no Columbus Children's Hospital em Franklin County entre os períodos 1948-50 e 1960-68. Este aumento não foi acompanhado pelo aumento do número de internações por qualquer outro tipo de meningite ou mesmo de qualquer outra patologia.

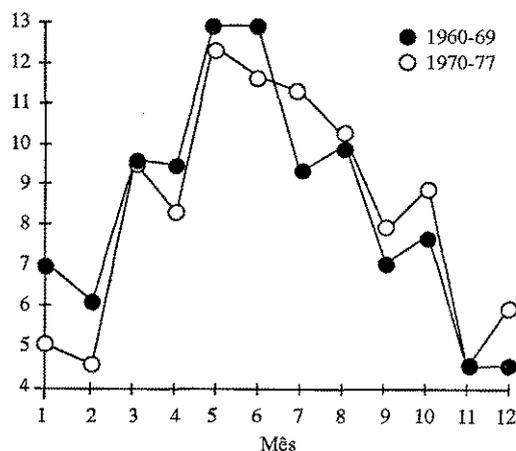
DAJANI⁷ refere um aumento gradativo de casos de meningite por *Hi* desde 1930, que se acentuou nos finais dos anos 50 e início de 1960. A melhoria do diagnóstico laboratorial, o uso incorreto de antibióticos em infecções de vias aéreas

as superiores e o declínio da prevalência de anticorpos bactericidas contra o Hib na população em geral poderiam, segundo o autor, explicar este aumento da morbidade.

SCHLECH⁴³, nos Estados Unidos, observou uma incidência semelhante à nossa de 1,4 por 100.000 habitantes, no período 1978-81. Este valor é inferior ao encontrado por outros autores^{13,15,18,38,48}.

A expansão da rede de atendimento hospitalar para casos de meningite, no ano de 1974, influenciou na qualidade do diagnóstico laboratorial. A maioria dos hospitais não dispunha de laboratório com técnicos qualificados para coleta, transporte e/ou para realização do exame. O material nem sempre era enviado para o Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Saúde Pública do Estado de São Paulo, e, quando vinha, freqüentemente não chegava em condições adequadas. Estes fatores dificultavam o isolamento do agente etiológico no líquido e conseqüentemente a confirmação do caso.

A maior ocorrência da doença no outono e inverno (gráfico 1) é, provavelmente, devida às características do mecanismo de transmissão da infecção por Hib de uma fonte primária a um novo hospedeiro. A transmissão é feita por meio de gotículas infectantes e secreções do nariz e da garganta durante o período infeccioso. A porta de entrada mais comumente é a nasofaringe³⁵. TEJANI⁴⁷ e GRANOFF¹⁸ afirmam que é freqüentemente relatada a presença de infecção assintomática entre comunicantes de um caso índice. Uma alta concentração de portadores precede e aumenta o risco da ocorrência da doença; e o portador constitui uma fonte de infecção importante para outros moradores.



A sazonalidade desta meningite é corroborada por vários autores. Estudos realizados na África mostram que a incidência aumenta na estação fria e seca, ou seja, no primeiro trimestre do ano^{4,20,21}. Este mesmo fenômeno foi encontrado por FRASER¹³ em Charleston County, South Carolina e SCHLECH⁴³ nos Estados situados no sul dos Estados Unidos.

A distribuição etária por nós encontrada, tabelas 2 e 3, não diverge daquela relatada pela maioria dos autores.

A contribuição do grupo etário menor de 5 anos é sempre referida como alta, ultrapassando quase sempre os 80%^{13,14,15,18,20,25,29,31,38,39,44,46}.

Uma menor participação dos menores de 1 ano, 38%, foi verificada por FINLAND¹² e por PETER³⁹ ao estudarem os casos internados nos hospitais Boston City e Children's Medical Center, na cidade de Boston, respectivamente.

FRASER^{13, 14, 15}, no estudo da incidência das meningites bacterianas em três cidades americanas, verificou que 39% dos casos eram menores de 5 anos.

Em termos de coeficientes, CADOZ⁴ observou, em Dakar, valor bem mais alto, 132 e 12,5 por 100.000 habitantes, respectivamente, para menores de 1 ano e de 1 a 4 anos. GRANOFF¹⁸, em Fresno County, Califórnia, encontrou um valor bem mais elevado que o nosso, 113,0 e 46,5.

MINER³¹ encontrou uma idade média de 54 meses ao estudar o comportamento epidemiológico das meningites bacterianas no Cairo. Contudo, a mediana foi próxima da encontrada por nós, 12 meses.

A maior suscetibilidade do grupo etário de 3 meses a 4 anos pode ser explicada segundo vários autores pela ausência de anticorpos bactericidas para Hib, contrastando com o que ocorre em adultos normais e crianças recém-nascidas. A ocorrência em recém-nascidos é atribuída a um baixo título de anticorpos maternos. Similarmente, quando a meningite ocorre em maiores de 5 anos, os pacientes apresentam geralmente um foco infeccioso parameningeo (sinusite ou mastoidite), hipogamaglobulinemia, diabetes mellitus, traumatismo do sistema nervoso central, alcoolismo, ou outras causas que comprometem a defesa do organismo⁴⁸.

Segundo UNDERMAN⁴⁸, os anticorpos maternos caem rapidamente, sendo pequena a atividade bactericida no soro nas crianças de 4 meses a 3 anos de idade.

FEIGIN¹⁰ refere que 30 a 75% dos recém-nascidos e mais de 28% dos adultos normais não possuem

anticorpos bactericidas. A presença de anticorpos detectáveis, segundo os autores, parece depender de um contato prévio entre uma fonte primária portadora de um Hib e um novo hospedeiro.

Uma outra hipótese levantada para explicar a presença de anticorpos bactericidas em pessoas maiores de 5 anos é a possibilidade de imunidade cruzada com bactérias Grampositivas e enterobactérias particularmente a *E. coli* 075 H5⁴³.

Contudo, outros trabalhos realizados por FEIGIN⁹ e Smith em FEIGIN⁹ registram que não parece, haver uma relação entre o desenvolvimento de uma meningite por Hib e a ausência de anticorpos bactericidas, ao encontrarem crianças internadas por meningite com altos títulos desses anticorpos no momento da admissão.

O antígeno capsular (PRP) parece ser importante na patogenicidade da doença. Em geral, o anticorpo antiPRP não tem sido encontrado nas crianças, com meningite por Hib no momento da admissão. Por outro lado, este anticorpo, que é passível de ser detectado por radioimunoensaio, está relacionado com a proteção da criança^{12,46}.

A distribuição espacial dos casos de meningite por Hi é resultante de condições de vida que propiciam ou dificultam a dinâmica da infecção.

A distribuição geográfica observada, tabelas 4 e 5, não foi suficientemente evidente para mostrar um comportamento epidemiológico distinto, como observado por MORAIS³⁴, IVERSSON²⁹, MORAES³³ e BARATA² ao estudarem os caracteres epidemiológicos da meningite meningocócica no período endêmico e no período epidêmico.

Uma hipótese para explicar este fenômeno seria a existência de gradientes de subnotificação entre os conglomerados. NERY-GUIMARÃES *et alii*³⁶, ao estudarem as meningites virais e bacterianas ocorridas no Rio de Janeiro no segundo semestre de 1978, referem que o "privilegiamento do espaço geográfico na organização dos serviços de saúde, (...) indicado pela divisão política do Município, impede que se revelem outros aspectos da distribuição da doença, mormente sua distribuição social". Os mesmos autores, ao considerarem o tipo de moradia como um indicador da condição social, observaram que os moradores em favela ou conjuntos habitacionais tinham risco de adquirir uma meningite bacteriana maior que os residentes em outros tipos de moradia. Este risco era 3 vezes maior para meningite meningocócica, 2,8 para as meningites devido ao *H. influenzae* e de 2,4 para as pneumocócicas. Uma crítica que se pode fazer a este trabalho é que não foi eliminada a influência da idade no diferencial de morbidade observado e, como demonstramos, a padronização

reduz sensivelmente a relação entre a maior e a menor incidência.

PARKE³⁸ refere uma incidência maior na população negra, atribuindo-a a uma maior aglomeração e à deficiência nutricional.

FRASER¹³ demonstrou em Charleston County, South California, que a meningite por Hi ocorre mais nas áreas pobres e habitadas por negros do que nas áreas ricas habitadas por brancos ou negros. A incidência na população negra foi indiretamente proporcional à mediana da renda familiar.

Segundo o mesmo autor, a ligação entre o nível de renda e a incidência da meningite não estaria muito clara. Uma correlação entre a aglomeração dentro das casas e a incidência específica por raça não foi encontrada. Provavelmente, a nutrição e a prevenção das complicações de uma infecção de ouvido ou das vias aéreas superiores pelo acesso adequado à assistência médica seriam fatores mais importantes que a aglomeração.

FRASER¹⁵ relata que a incidência da meningite em Bernalillo County, New Mexico, era significativamente diferente entre a população de baixo nível educacional e com baixa renda e uma população com alto nível educacional com baixa ou alta renda familiar.

TARR⁴⁶, em seu estudo realizado em Rodhe Islands, onde 92% da população é branca, não observou nenhuma relação entre a incidência da meningite por Hi com a renda, com o nível educacional nem com a aglomeração. O autor atribui a diferença observada por outros autores entre as populações branca e negra a um fator provavelmente inerente à raça e não a uma diferença da situação econômica dos negros.

Estes trabalhos merecem, contudo, a crítica elaborada por LAURELL²⁶ em seu estudo realizado em dois povoados mexicanos com formações sociais capitalistas em diferentes graus de desenvolvimento. Esta autora comenta que a maneira clássica de se analisar o social pela "investigação de alguns indicadores das condições sócio-econômicas ou culturais e de saúde para detectar variações concomitantes entre eles" apresenta "principalmente duas debilidades. Por um lado, reduz o sistema de complexas inter-relações a simples fatores que não permitem entender a articulação de todas as dimensões sociais em uma totalidade; por outro lado, atribui aos indicadores um valor em si que não têm, já que um mesmo indicador pode expressar fenômenos sociais diferentes, dependendo do conjunto das relações sociais presentes em uma sociedade historicamente definida".

QUADRO 1

Subdistritos e Distritos do Município de São Paulo segundo zona.

Central	Intermediária	Periférica
Aclimação	Barra Funda	Brasilândia
Alto da Moóca	Belenzinho	Butantã
Bela Vista	Bom Retiro	Cangaíba
Cambuci	Brás	Capela do Socorro
Cerqueira César	Ibirapuera	Casa Verde
Consolação	Ipiranga	Emelino Matarazzo
Indianópolis	Lapa	Guaianazes
Jardim América	Moóca	Itaquera
Jardim Paulista	Pari	Jabaquara
Liberdade	Santa Efigênia	Jaraguá
Perdizes	Santana	Limão
Pinheiros	Saúde	Nossa Senhora do Ó
Santa Cecília	Sé	Parelheiros
Vila Madalena	Tatuapé	Penha de França
	Vila Mariana	Perus
		Pirituba
		Santo Amaro
		São Miguel Paulista
		Tucuruvi
		Vila Formosa
		Vila Guilherme
		Vila Jaguara
		Vila Maria
		Vila Matilde
		Vila Nova
		Cachocrinha
		Vila Prudente

Fonte: SÃO PAULO-FUNDAÇÃO SEADE, (1977)

O quadro 2 mostra a letalidade obtida por diversos autores e por nós, tabela 6. Na comparação das diferentes taxas deve-se levar em conta o local e época onde o autor obteve sua casuística. Com freqüência, os dados se referem a estudos realizados em hospitais sem que sejam analisados ou comentados os critérios que regem as respectivas internações.

A letalidade por nós encontrada foi próxima daquela verificada nos países desenvolvidos na era pré-antibiótica. Assim, FINLAND¹² obteve um valor de 40% para o período de 1935 a 1951 e um valor bem mais baixo para o período de 1953-72. SMITH⁴⁴ refere que a letalidade em Franklin County, de 1942 a 1950, era de 25%.

Nos países subdesenvolvidos, a letalidade tem variado de 26 a 57%^{4,20,31}.

O quadro 3 mostra a letalidade da meningite por *H. influenzae* segundo autor, faixa etária, período e local. A letalidade por nós observada, tabela 7, foi sempre superior às verificadas nos países desenvolvidos.

QUADRO 2

Meningite por *H. Influenzae* Letalidade segundo autor, período e local.

Autor	Letal. (%)	Período	Local
GUIRGUIS e col, (1983)	57	1977-78	Cairo
FINLAND & BARNES, (1977)	40	1935-51	Boston City Hospital
Atual estudo	2	1953-72	São Paulo
	39	1960-69	
	21	1970-77	
BASTOS e col, (1970)	36	1958-67	H. Emílio Ribas
CADOZ e col, (1981)	34	1970-79	Dakar, Senegal
MINER & EDMAN, (1978)	26	1971-75	Abbassia Fever Hosp. Cairo, Egito
SMITH & HAYNES, (1972)	25	1942-50	Franklin, USA
	8	1951-59	
	4	1960-68	
FRASER e col, (1974)	23	1964-71	Bemalillo, USA
FRASER e col, (1973b)	14	1961-71	Charleston, USA
JONSSON & ALVIN, (1971)	10	1956-67	Estocolmo
DAVEY e col, (1982)	8	1968-77	East Birmingham Hosp
HODGES & PERKINS, (1975)	4	1968-77	Birmingham, England
SCHLECH e col, (1984)	7	1949-73	Ohio State Hospital
	7	1978	Estados Unidos
WARD e col, (1981)	6	1971-77	Alaska, USA
PARKE e col, (1972)	5	1966-70	Mecklenburg, USA
FRASER e col, (1973a)	5	1959-70	Olmsted, USA
McGOWAN e col, (1974)	4	1951-72	Boston City Hospital
GEISELER e col, (1980)	3	1954-76	Municipal Contagious Hosp. Chicago
ISPAHANI, (1983)	3	1974-80	Nottingham, England

QUADRO 3

Meningite por *H. Influenzae*. Letalidade segundo autor, período e local.

Autor	<1 anos	1 a 4 anos	Período	Local
JONSSON & ALVIN, (1971)	11	10	1956-67	Estocolmo
FINLAND & BARNES, (1977)	17		1935-72	Boston City Hosp.
MINER & EDMAN, (1978)	40	14	1971-75	Abbassia Fever Hosp.
GUIRGUIS e col, (1983)	57	57	1977-78	Cairo
HAJI ILEMESKEL & TAFARI, (1978)	28		1975-76	Addis Abeba
McCRACKEN, (1984)	/..2../		1960-72	Park Mem Hosp. Dallas
	/..3../		1981-82	
Atual estudo	40	18	1960-77	S. Paulo

Em relação a letalidade de meningite por Hi, segundo número de leucócitos no liquor de entrada, tabela 8, à semelhança com HOGGES²², não encontramos diferença significativa na letalidade.

As zonas central, intermediária e periférica não são homogêneas quanto aos recursos de saúde colocados à disposição da população. Na zona central existiam, em 1980, 14.509 leitos hospitalares, que representavam 13,42 leitos por 1.000 habitantes, enquanto na zona periférica o número de leitos era de 6.234 com índice de 1,09 leito por 1.000 habitantes, (JATENE inf. mimeo., 1981).

Essa heterogeneidade, contudo, não afetou a gravidade da doença, tabela 9. Ela foi alta nas 3 zonas. Uma análise mais acurada como o cálculo da incidência e da letalidade em populações com diferentes graus de acesso aos serviços de saúde e residentes na mesma zona permitiria um melhor esclarecimento sobre a questão.

Da mesma forma que a incidência, a letalidade entre as diferentes zonas não foi suficientemente evidente para mostrar um comportamento epidemiológico distinto.

Essa letalidade, homogênea entre os diversos conglomerados, por nós estudados, vem de certa forma invalidar a hipótese de que os gradientes de subnotificação, propostos por NERY-GUIMARÃES²⁶, poderiam explicar o comportamento epidemiológico observado na distribuição espacial da meningite por Hi. A letalidade deveria ser maior nos locais onde a subnotificação fosse eventualmente maior. É sabido, de uma for-

ma geral, que os casos mais graves são melhor notificados do que os demais.

CONCLUSÕES

No período de 1960-77 foram confirmados 900 casos de meningite por Hi. O coeficiente médio por 100.000 habitantes foi de 0,89. No período 1960-69, a incidência da doença se manteve constante. No octênio seguinte observou-se uma pequena tendência de queda.

Os meses de maio a agosto apresentaram um aumento significativo de casos nos períodos 1960 a 1969 e 1970 a 1977. Esta distribuição se deve às características de transmissão da infecção.

Os menores de 5 anos responderam por 91,2% dos casos. O grupo etário de maior risco de adoecer foi o dos menores de um ano com coeficiente médio de 23,26 por 100.000 habitantes. A incidência da doença entre as diferentes zonas não se mostrou significativamente diferente. As zonas central e intermediária possuíam uma incidência próxima de 0,51 e 0,63 por 100.000 habitantes e a zona periférica 2,1 vezes mais, 1,06. Essas diferenças se reduziram substancialmente quando foram padronizados os coeficientes, usando como variável de controle a idade dos pacientes.

A letalidade média no período 1960-77 foi de 31,3%, com um valor de 40% para os menores de um ano.

A letalidade foi independente do número de leucócitos por mm³ no liquor de entrada e da zona de residência.

RIALA6/682

MORAES, J.C. & GUEDES, J.S. - Epidemiology of meningitis by *Haemophilus influenzae* in São Paulo Municipality, 1960-77. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (2):219-229, 1989.

ABSTRACT: The purpose of this study is to better understand the epidemiology of meningitis caused by *H. influenzae* in the city of São Paulo during the period 1960-77. The survey was performed by a group of professors from the department of social medicine of the "Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo", public health physicians and medical students. Data were obtained directly from the patients records and registered on a pre-coded form. Cases of *H. influenzae* meningitis were confirmed by culture. During the study, 900 cases of *H. influenzae* meningitis were confirmed, giving an average rate of 0.89 cases per 100,000 population. Children <5 years old represented 91% of the cases, 63 percent of them being less than one year old. The average rate for children <1 year old was 23.3 cases per 100,000 population. The average case fatality rate for the period 1960-77 was 31 percent. The highest case fatality rate occurred in children <1 year old and was 40 percent. The central, intermediate and periphery zones didn't show significant different rates of incidence. The age standardized morbidity rates for these zones were, respectively 0.8, and 0.9.

DESCRIPTORS: bacterial meningitis; meningitis by *Haemophilus influenzae*; epidemiology of *Haemophilus influenzae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARMITAGE, P. — Further analysis of qualitative data. In *Statistical Methods in Medical Research*. 2nd ed. Oxford, *Blackwell Scientific Publications*, 1973. p. 362-93.
2. BARATA, R. C. B. — Epidemia de doença meningocócica na cidade de São Paulo 1970-1977. Aspectos epidemiológicos, sociais e políticos. São Paulo, 1985. Tese, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Mimeografada.
3. BASTOS, C.O.; TAUNAY, A.E.; TIRIBA, A.C.; GALVAO, P.A.A.; SESSO, J.; FILLIPI, J.; PUPO, A.A. & GODOY, C.V.F. de — Meningites: considerações gerais sobre 6957 casos internados no Hospital "Emílio Ribas" (São Paulo) durante o decênio 1958-67. Ocorrência, etiologia e letalidade. *Rev. Assoc. médica brasileira* 16 (1): 27-32, 1970.
4. CADOZ, M.; DENIS, F. & MAR, I.D. — Étude épidémiologique des cas méningites purulentes hospitalisés à Dakar pendant la décennie 1970-1979. *Bull. WHO* 59 (4): 574-84, 1981.
5. CAMEL, F. — Método geométrico modificado. In *Estatística Médica y de Salud Pública*. Merida, Venezuela, Universidad de Los Andes, 1974. p. 293-5.
6. CARVALHEIRO, J.R. — Processo migratório e disseminação de doenças. In *Texto de apoio de Ciências Sociais 1*, Rio de Janeiro, Abrasco, 1983. p. 29-55.
7. DAJANI, A.S.; ASMAR, B.I. & THIRUMOORTHY, M.C. — Syst *Haemophilus influenzae* disease: an overview. *J. Pediatr.* 94 (3): 355-64, 1979.
8. DAVEY, P.G.; CRUIKSHANK, J.K. McMANUS, I.C.; MAHOOD, B.; SNOW, M.H. & GEDDES, A.M. — Bacterial meningitis — ten years experience. *J. Hyg., Cambridge*, 88: 383-401, 1982.
9. FEIGIN, R.D. & DODGE, P.R. — Bacterial meningitis: Newer concepts of pathophysiology and neurologic sequelae. *Pediatr. Clin. North Am.* 23 (3): 541-57, 1976.
10. FEIGIN, R.D. & SHEARER, W.S. — Opportunistic infection in children. Part I. In the compromised host. *Pediatr.* 87: 507-14, 1975.
11. FILICE, G.A.; ANDREWS, J.S.; HUDGINS, M.P. & FRASER, D.W. — Spread of *Haemophilus influenzae*: secondary illness in household contacts of patients with *H. influenzae*. *Am. Dis. Child* 132: 757-9, 1978.
12. FINLAND, M. & BARNES, M.W. — Acute Bacterial meningitis at Boston City Hospital during 12 selected years, 1935-1972. *J. Dis. Infect.* 136 (3): 400-15, 1977.
13. FRASER, D.W.; DARBY, C.P.; WOECHLER, R.E.; JACOBS, C.F. & FELDMAN, R.A. — Risk factor in bacterial meningitis: Charleston County, South Carolina. *J. Dis. Infect.* 127 (3): 271-7, 1973.
14. FRASER, D.W.; HENKE, C.E. & FELDMAN, R.A. — Changing patterns of bacterial meningitis in Olmsted County, Minnesota, 1935-70. *J. Infect. Dis.* 128 (3): 300-7, 1973.
15. FRASER, D.W.; GEIL, C.C. & FELDMAN, R.A. — Bacterial meningitis in Bernalillo County, New Mexico: A comparison with three other American populations. *Amer. J. Epidemiol.* 100 (1): 29-34, 1974.
16. FREEDMAN, L.S. — The use of Kolmogorov-Smirnov type statistic in testing hypotheses about seasonal variation. *J. Epidemiol. Community Health* 33: 223-8, 1979.
17. GEISELER, P.J.; NELSON, K.E.; LEVIN, S.; REDDI, K.T. & MOSES V.K. — Community-acquired purulent meningitis: a review of 1316 cases during the antibiotic era, 1954-1976. *Rev. Infect. Dis.* 2(5): 725-44, 1980.
18. GRANOFF, D.M. & BASCEN, M. — *Haemophilus influenzae* infections in Fresno County, California: a prospective study of the effects of age, race, and contact with a case on incidence of disease. *J. Infect. Dis.* 141 (1): 40-6, 1980.
19. GREENE, G.R. — Meningitis due to *Haemophilus influenzae* other than type b: case report and review. *Pediatrics*, 62 (6): 1021-5, 1978.
20. GUIRGUIS, N.; HAFEZ, K.; KHOLY, M.A. EL; ROBBINS, J.B. & GOTSCHLICH E.C. — Bacterial meningitis in Egypt: analysis of CSF isolate from hospital patients in Cairo, 1977-78. *Bull. WHO*, 61 (3): 517-24, 1983.
21. HAILEMESKEL, H. & TAFARI, N. — Bacterial Meningitis in childhood in an African city: - factors influencing aetiology and outcome. *Acta Outeome. Scand.* 67: 725-30, 1978.
22. HODGES, G.R. & PERKINS, R.L. — Acute bacterial meningitis: an analysis of factors influencing prognosis. *The Am. J. med. Sci.* 270 (3): 427-40, 1975.
23. ISPAHANI, P. — Bacterial meningitis in Notting-ham. *J. Hyg., Cambridge* 91: 189-201, 1983.
24. IVERSSON, L.B. — Aspectos epidemiológicos da meningite meningocócica no Município de São Paulo (Brasil) no período de 1968-1974. *Rev. Saúde Públ.* 10:1-16, 1976.
25. JONSSON, M. & ALVIN, A. — A 12-year review of acute bacterial meningitis in Stockholm. *Scand. J. Infect. Dis.* 3:141-50, 1971.
26. LAURELL, A.C.; BLANCO, J.; MACHETTO, T.; PALOMO, J.; PEREZ, C.; CHAVEZ, M.R. DEL; URBINA, M. & VELAZQUEZ — Enfermedad y desarrollo: análisis sociológico de la morbilidad de dos pueblos Mexicanos. *Rev. Mex. Ciênc. Polít.* 84: 131-58, 1977.
27. LAURENTI, R.; JORGE, M.H.P.M.; LEBRÃO, M.L. & GOTLIEB, S.L.D. — Padronização de coeficientes. In *Estatísticas de Saúde*. São Paulo, EPU, 1985. p. 133-42.
28. McCracken, G. A. — Management of bacterial meningitis current status and future prospects. *Am. J. Med.* 215:215-23, 1984.
29. McGOWAN, J.E.JR.; KLEIN, J.O.; BRATTON, L.; BARNES, M.W. & FINLAND, M. — Meningitis and bacteremia due to *Haemophilus influenzae*: occurrence and mortality at Boston City Hospital in 12 selected years, 1935-1972. *J. infect. Dis.* 130 (2): 119-24, 1974.
30. MELLES, C.E.A. — Influência da antibioticoter-

- pia prévia no diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas em São Paulo. São Paulo, 1982. [Tese - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, mimeografada.]
31. MINER, W.F. & EDMAN, D.C. — Acute bacterial meningitis in Cairo, Arab Republic of Egypt. 1 January 1971 through 31 December 1975. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27 (5): 986-94, 1978.
32. MORAES, J.C.; GUEDES, J.S. & BARATA, R.C.B. — Métodos de estudo do processo epidêmico. In ABRASCO ed. Textos de apoio Epidemiologia 1. Rio de Janeiro, Abrasco, 1985. p. 87-125.
33. MORAES, J.C. — Epidemiologia das meningites bacterianas por *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e Enterobactérias no Município de São Paulo, 1960-77. São Paulo, 1988. [Tese — Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, mimeografada.]
34. MORAIS, J. S.; MUNFORD, R.S.; RISI, J.B.; ANTEZANA, E. & FELDMAN, R. A. — Epidemic disease due Serogroup C *Neisseria meningitidis* in São Paulo, Brazil. *J. Infect. Dis.* 130: 217-24, 1974.
35. NELSON, J.D. — How preventable is bacterial meningitis. *The New Engl. J. Med.* 307 (20): 1265-7, 1982.
36. NERY-GUIMARÃES, R.; BITTENCOURT, L.C.M. & PASTOR, M.V.A. — Meningites virais e bacterianas no Município de Rio de Janeiro (Brasil). Algumas considerações sobre o sistema de informações em saúde e sobre a distribuição da doença no espaço urbano. *Rev. Saúde Públ.* São Paulo 15: 379-94, 1981.
37. ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAUDE — Meningite por *Haemophilus influenzae* In Controle das Doenças infecciosas no Homem, 13 ed, Washington, DC. Organização Panamericana de Saúde, 1983. p. 246-347.
38. PARKE, J.C.; SCHNEERSON, R. & ROBBINS, L.B. — The attack, age, incidence racial distribution, and case fatality rate of *Haemophilus influenzae* type b meningitis in Mecklenburg County, North Carolina. *J. Pediatr.* 81 (4): 765-69, 1972.
39. PETER, G. & SMITH, D.H. — *Haemophilus influenzae* meningitis at the Children's Hospital Medical Center in Boston, 1958 to 1973. *Pediatrics* 55 (4): 523-6, 1975.
40. PONKA, A. & PETTERSON, T. — The incidence aetiology of central nervous system infections in Helsinki in 1980. *Acta neurol. Scand.* 66: 529-35, 1982.
41. SÃO PAULO FUNDAÇÃO SEADE. — Subdivisão do Município de São Paulo em áreas homogêneas, São Paulo, 1977.
42. SHELD, W.M. — Bacterial meningitis in the patient at risk: intrinsic risk factors and host defense mechanisms. *Am. J. Med.*: 193-207, 1984.
43. SCHLECH, W.F.; WARD, J.I.; BAND, J.D.; HIGHTOWER, A.; FRASER, D.W. & BROOME, C.V. — Bacterial meningitis in the United States, 1978 through 1981. The National bacterial meningitis surveillance study. *JAMA* 253(12): 1749-54, 1985.
44. SMITH, E.W.P. & HAYNES, R.E. — Changing incidence of *Haemophilus influenzae* meningitis. *Pediatrics* 50(5): 723-7, 1972.
45. TAKEDA, A. K.; UMEKITA, L.F.; BOSCARDIN, N.B.; MELLES, C.E.A. & TAUNAY, A. E. - Imunoelctroforese cruzada no diagnóstico da meningite por *Haemophilus influenzae*, tipo b. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 39 (2): 165-9, 1979.
46. TARR, P.I. & PETER, G. — Demographic factors in the epidemiology of *Haemophilus influenzae* meningitis in young children. *J. Pediatr.* 92(6): 884-8, 1978.
47. TEJANI, A.; DOBIAS, B.; NANGIA, B.S. & VELKURU, H. — Intrafamilial spread of *Haemophilus*. *Am. J. Dis. Child* 131: 778-81, 1877.
48. UNDERMAN, A.E. & LEEDON, J.M. — Bacterial meningitis. *DM* 24 (5): 1-63, 1978.
49. WARD, J.I; MARGOLIS, H.S.; LUM, M.K.; FRASER, D.W. & BENDER, T.R. — *Haemophilus influenzae* disease in Alaskan Eskimos: characteristics of a population with an usual incidence of invasive disease. *Lancet* 1: 1281-5, 1981.
50. WILSON, G.S. & MILES, A. — *Principles of bacteriology, virology and immunity*. 6th. ed, London, Edward Arnold, 1975.

Recebido para publicação em 21 de setembro de 1989.

Produzido pela TEC art Editora Ltda.
TEL: (011) 255-7531 - S. Paulo