

VOLUME 29/30

N.º UNICO

1969/70

REVISTA
do
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
SÃO PAULO — BRASIL

REVISTA
DO
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

REDATOR RESPONSÁVEL

AUGUSTO DE ESCRAGNOLLE TAUNAY
Diretor do Instituto Adolfo Lutz

COMISSÃO DE REDAÇÃO

JOSÉ PAULO G. LACERDA
JOSÉ ROBERTO CARNEIRO NOVAIS
LUIS FLORENCIO SALLES GOMES
MÁRIO SCARPELLI
WALDOMIRO PREGNOLATTO

SECRETARIA-REDATORA

DEBORA D. E. REBOCHO

REDAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO

BIBLIOTECA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CAIXA POSTAL, 7027
SÃO PAULO, S. P. — BRASIL

ENDEREÇO TELEGRÁFICO: IALUTZ

REVISTA ANUAL

TIRAGEM: 1.000 EXEMPLARES

REV. INST. ADOLFO LUTZ

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Rev. Inst. Adolfo Lutz	São Paulo	v. 29/30	1969/70
------------------------	-----------	----------	---------

CONTEÚDO

Pág.

Leptospiroses no Estado do Pará e Território Federal do Amapá <i>Leptospirosis in Pará and Amapá, Brazil</i>	
CARLOS AMARAL COSTA; MANOEL REZENDE & ZÉIA LINS	1
Leptospiroses no Rio Grande do Sul <i>Leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil</i>	
EGOMAR LUND EDELWEISS	5
Leptospirose com sôro-aglutinação positiva para <i>Leptospira javanica</i> em Bôca do Acre, Amazonas <i>Human leptospirosis by Leptospira javanica in Bôca do Acre, Amazonas, Brazil</i>	
EDUARDO AZEREDO COSTA; MARCELO OSWALDO ALVARES COR- RÊA; VAIL NATALE & TERUÊ SADATSUNE	13
Nove anos de Leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo <i>Nine years of Leptospirosis at the Instituto Biológico of São Paulo, Brazil</i>	
CARLOS ALMEIDA SANTA ROSA; ANTÔNIO FERNANDO PESTANA DE CASTRO; ANTÔNIO SÉRGIO DA SILVA & JULIETA MYIA TERUYA	19
Leptospiroses em São Paulo <i>Leptospirosis in São Paulo, Brazil</i>	
MARCELO OSWALDO ALVARES CORRÊA	29
Avaliação do suco de laranja em refrescos, concentrados e outros produtos derivados <i>Chemical determination of orange juice in refreshments, concentrated and other derivative products</i>	
WALDOMIRO PREGNOLATTO & MYRNA SABINO	39
Adulterantes na panificação. Identificação do bromato de potássio <i>Adulterant in bread. Identification of potassium bromate</i>	
WALDOMIRO PREGNOLATTO; CECY M. T. CHAHIN & MYRNA SABINO	45

Purificação de <i>Toxoplasma gondii</i> de exsudato peritoneal de camundongo, em coluna de algodão de nylon	
<i>Use of nylon-cotton columns for the purification of Toxoplasma gondii</i>	
AUGUSTA KIYOMI TAKEDA; MATHILDE RASKIN & RENATE DANEMANN	51
Modificação do meio de Baracchini para o cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	
<i>Modification of Baracchini's medium for the culture of Trypanosoma cruzi</i>	
OCTAVIO BARACCHINI	57
Método para cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i> em larga escala por arejamento (borbulhamento de ar)	
<i>Culture of Trypanosoma cruzi in great volums by air bubling</i>	
ETTORE RUGAI & ALTEMISIA MOREIRA DE SOUZA	61
Pesquisa e dosagem de aflatoxina em amendoim e derivados e em outros cereais	
<i>Search and dosage of aflatoxin in peanuts and derivatives and other cereals</i>	
WALDOMIRO PREGNOLATTO & MYRNA SABINO	65
Emprêgo da técnica de Kolmer, modificada, na fixação do complemento, usando antígeno metílico de <i>Trypanosoma cruzi</i> no diagnóstico da Doença de Chagas	
<i>Modified Kolmer complement fixation test using methanolic antigen of Trypanosoma cruzi. in Chagas' disease diagnosis</i>	
OCTAVIO BARACCHINI & MANOEL DE BRITTO E SILVA	73
Manutenção de esporos de <i>Penicillium notatum</i> por liofilização (Observação durante 25 anos)	
<i>Maintenance of spores of Penicillium notatum by lyophilization (Observation during 25 years)</i>	
HASSIB ASHCAR	81
Conservação do leite "in natura" por meios físicos, químicos e bioquímicos. Peróxido de hidrogênio como conservador	
<i>Milk "in natura" preservation by physical, chemical and biochemical methods. Hydrogen peroxide used as an preservative.</i>	
ALEXANDRE MELLO FILHO & LUIZ CELSO DE CASTRO	85
Contribuição para o estudo epidemiológico da toxoplasmose. Levantamento sorológico em índios do Alto Xingú, Brasil Central	
<i>Contribution to the study of the toxoplasmosis epidemiology. Serologic survey among the indians of the upper Xingu river, Central Brazil</i>	
ROBERTO G. BARUZZI	105

AOS COLABORADORES

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

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Todos os artigos destinados à Revista deverão ser redigidos na ortografia oficial, apresentados em duas vias (original e primeira cópia), datilografados com espaço duplo em folhas de papel formato ofício, numeradas no ângulo superior direito, com margens de 3 cm de ambos os lados. Às ilustrações (fotográficas, desenhos, gráficos, fórmulas, equações, mapas e diagramas), legendas e rodapés deverão ser apresentados a parte, devidamente identificados, assinalando-se, no texto, onde deverão ser inseridos.

No preparo do texto, os autores deverão, sempre que possível, obedecer à seguinte ordem:

- Título em português
- Título em inglês
- Nome do autor ou autores (dados pessoais em rodapé)
- Resumo em inglês
- Introdução
- Material e métodos
- Resultados
- Discussão
- Conclusões
- Resumo em português
- Agradecimentos
- Referências bibliográficas

TÍTULO — Deverá ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho.

RESUMOS — Não deverão exceder 200 palavras. Deverão ser concisos e claros, pondo em relêvo de forma precisa os fatos essenciais necessários à conclusão.

ABREVIATURAS — Serão evitadas, ou usadas apenas as que obedecem às normas nacionais ou, na falta destas, às internacionais. Os pesos e medidas (inclusive suas abreviaturas) deverão ser expressos no Sistema Métrico Decimal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — Deverão ser apresentadas somente as de trabalhos consultados ligados ao assunto e citados no texto. Havendo um único autor será indicado o último sobrenome, seguido das iniciais do(s) prenome(s): BARBOSA, A. J. Quando a obra tem dois autores, mencionam-se ambos, na ordem em que aparecem na publicação, sempre o sobrenome antecedendo o prenome, ligado por "&": GOMES, J. A. & TOURAINÉ, M.M.A. Para mais de dois autores, quando a identificação da obra o exigir, mencionam-se todos, separados por ";": ROSENBERG, M.; YAKOVLEV, P. I.; van der HOEVE, J.; AMATO Neto, V.; VOGT, H. Quando a identificação da obra o não exigir, menciona-se o primeiro autor, seguido da expressão et alii: RACHOU, R. G. et alii.

No texto — serão numeradas, em ordem crescente, escritas em versal, com número alto ao lado do sobrenome do autor: ... segundo GOMES⁵.

Na lista de referências — serão ordenadas numéricamente, em ordem alfabética, como segue:

Para artigos

Sobrenome do autor (ou autores) seguido das iniciais, título do trabalho, título do periódico (abreviaturas no "World List of Scientific Periodicals"), volume, número, página inicial e final e ano de publicação. Ex:

MALLORY, F. B. — Cirrhosis of the liver. Five different types of lesions from which it may arise. Bull. Johns Hopk. Hosp. 22:69-75, 1911.

Para livros

Sobrenome do autor (ou autores ou editor responsável) seguido das iniciais, título, edição, tradução (se fôr o caso), local de publicação, editor comercial, ano de publicação, número do volume, página(s) citada(s).

AMATO Neto, V.; CAMPOS, R.; FERREIRA, C. C. — Diagnóstico das parasitoses intestinais pelo exame de fezes. 2.^a ed. São Paulo, Atheneu, 1963. p. 125.

ILUSTRAÇÕES — *Deverão ser citadas no texto como "Fig.", numeradas e vir acompanhadas de legendas explicativas. Os desenhos, gráficos, fórmulas, equações, mapas e diagramas deverão ser feitos a nanquim preta, em papel vegetal e confeccionados de modo a poderem ser reduzidos na clichéria a 1/2 ou 1/3 do tamanho original, sem perda de nitidez ou legibilidade. As fotografias serão apresentadas em envelope a parte; deverão ser nítidas e de bom contraste, e trazer no verso o nome do autor, título do artigo e número com que irão figurar no texto.*

QUADROS E TABELAS — *Não deverão exceder as dimensões do texto da Revista. Os respectivos títulos deverão indicar claramente o conteúdo; se possível, seguir as normas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Nenhuma casa, em quadros ou tabelas, deverá ficar vazia; a ausência de dados será representada por:*

- quando o fenômeno não existe
- 0; 0,0; 0,00 quando o fenômeno existe, não atingindo o seu valor, porém, a unidade adotada no quadro
- ... quando o dado é desconhecido, não implicando, porém, afirmar ou não a existência do fenômeno.

Quando o fenômeno fôr mensurável, deverá ser expresso de maneira a somente figurarem os algarismos significativos.

DA PUBLICAÇÃO

- 1 *A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação.*
- 2 *Na publicação do artigo, constará obrigatoriamente, em rodapé, a data de recebimento.*
- 3 *Os originais de trabalhos aceites para publicação não serão devolvidos aos autores.*
- 4 *Os autores terão direito a 70 separatas; quando desejarem maior número, deverão entender-se com a secretária da Revista.*
- 5 *No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.*
- 6 *Solicita-se aos autores indicarem o endereço para correspondência.*
- 7 *É proibida a reprodução no todo ou em parte de trabalhos publicados na Revista, sem prévia autorização do autor responsável e da Comissão de Redação da Revista. É permitida, entretanto, a reprodução de resumos, com a devida citação bibliográfica.*

LEPTOSPIROSES NO ESTADO DO PARÁ E TERRITÓRIO FEDERAL DO AMAPÁ ⁽¹⁾

LEPTOSPIROSIS IN PARÁ AND AMAPÁ, BRAZIL

CARLOS AMARAL COSTA ⁽²⁾
MANOEL REZENDE ⁽²⁾
ZÉA LINS ⁽³⁾

SUMMARY

Human leptospirosis was confirmed in the city of Belém, Pará State, Brazil. Eight cases were diagnosed, six due to *L. icterohaemorrhagiae*, one to *L. canicola* and one to *L. australis* A. Two fatal cases due to infection with *L. icterohaemorrhagiae* were recorded.

Serological examination of sylvatic animals gave negative results for thirty-four birds. Antibodies to *L. panamá* were detected in a single specimen of *Proechimys* sp. and to *L. tarassovi* in a single specimen of *Phylander opossum* in a total of ten rodents and seventeen marsupial examined.

Studies on eleven primatas revealed the presence of soro-agglutinins to *L. tarassovi* in *Cebus* sp., *L. grippotyphosa* in *Simiri* sp. and *L. djasimani* in *Sanguinus midas*.

O Estado do Pará incluído na chamada "Amazônia" faz parte da região neotropical, constituindo uma vasta área propícia para disseminação e endemicidade das leptospiroses. As condições mesológicas de umidade, temperatura e riqueza da fauna podem condicionar reservatórios importantes de leptospira, considerando-se ainda o fato de, em determinadas zonas, viverem comumente os animais em contato íntimo com o homem, constituindo tudo isso um conjunto de fatores que devem interferir, de maneira marcante, na existência de leptospiroses, em proporções mais acentuadas do que aquelas reveladas por dados atuais.

Nos Estados do Sul, o problema da leptospirose vem sendo muito bem estudado sob o aspecto clínico e epidemiológico, o que contrasta com o dos Estados do Norte, onde raros casos relatados revelam apenas a existência da espiroquetose.

Apesar de o primeiro caso clínico no Brasil ter sido assinalado em Belém, por MacDowell em 1911, decorreu mais de meio século para que novos casos fossem descritos, já com auxílio dos recursos laboratoriais que não existiam naquela época.

Os primeiros casos diagnosticados sorologicamente em nossos Estados foram relatados, em 1966, por RESENDE *et alii*⁶. A partir dessa data, novos pacientes foram identificados, de tal maneira que, atualmente, foi possível catalogar nove casos, todos com comprovação sorológica positiva para algumas espécies de leptospira, dois dos quais apresentando lesões sugestivas de leptospirose, no exame anatomopatológico realizado.

Considerando o aspecto epidemiológico, convém salientar serem os arredores de Belém alagadiços, com áreas pantanosas e cortadas por igarapés, terreno úmido, portanto, onde a população de ratos é bem

(1) Trabalho apresentado ao Simpósio sobre Leptospiroses — Tema oficial do V Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, realizado no Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da U.S.P., São Paulo, Brasil, de 23 a 26 de fevereiro de 1969.

(2) Assistente de Ensino da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Pará.

(3) Do Instituto Evandro Chagas — Fundação S. E. S. P.

expressiva. Os pacientes mencionados procediam todos dessa área e eram adultos.

A espécie de *Leptospira* mais frequentemente encontrada em casos humanos foi a *L. ichterohaemorrhagiae* havendo um caso de associação com *L. canicola* com sôro-aglutinações de títulos relativamente elevados. Os títulos atingidos foram, em

geral, relativamente altos, chegando a alcançar valores de 1/6 400. Um paciente apenas apresentou aglutininas para *L. australis A*, com título de 1/400. Dois casos fatais foram assinalados, tendo um de nós (Z.C.L.) obtido isolamento positivo em um dêles a partir de "hamster" inoculado com material de necrópsia (*pool* de rim, fígado e pulmão).

QUADRO I
Leptospirose em Belém, Pará

Nome	Idade (anos)	Profissão	Sorotipos diagnosticados	Títulos
I.N.	34	Serralheiro	} <i>L. ichterohaemorrhagiae</i>	1/3 200
R.T.O.	35	Carpinteiro		1/6 400
J.C.M.*	38	Feirante		1/3 200
A.S.**	42	Pintor		1/1 800
H.G.	41	Braçal		1/6 400
J.G.	43	Braçal		1/200
N.G.L.	34	Pedreiro	} <i>L. canicola</i> <i>L. australis A</i>	1/6 400
M.S.	48	Func. Público		1/1 600 1/400

* Falecido

** Falecido — isolada *Leptospira*

Com relação aos exames complementares, os resultados são condizentes com os que têm sido relatados pelos especialistas. Porém, salientamos que as determinações da transaminase glutâmico-pirúvica e transaminase glutâmico-oxalacética não ultrapassaram 250 unidades Sigma-Franckel, confirmando os achados de ELKIS *et alii*³ e de Monteverde & Fumagalli na Itália, constituindo as dosagens das transaminases um elemento altamente valioso sob o ponto de vista de diagnóstico diferencial com a hepatite a vírus, cujos valores estão muito acima da normalidade. Merece ser salientado o fato de que em três casos com os exames complementares sugerindo leptospirose, a dosagem de T.G.O. revelou ser mais elevada que a T.G.P., o que não ocorre normalmente. Posteriormente foi constatado que se tratava de cancer de fígado e não de leptospirose. Naturalmente que observação em pequeno número de casos dêsse detalhe não permite tirar con-

clusões definitivas a respeito do valor da T.G.O. em comparação com a T.G.P. em doença maligna do fígado; mas poderá ser motivo para investigações nêsse sentido.

Na localidade de Monte Dourado (Município de Almeirim), situado à margem do rio Jarí, afluente do Amazonas, foi realizado, pelo Instituto Evandro Chagas, inquérito sorológico em 56 habitantes entre 2-65 anos com resultados negativos, sendo utilizados vinte variedades de antígenos.

Os habitantes desta localidade dedicam-se quase que exclusivamente ao trabalho de desmatamento da região e condições básicas de saneamento são precárias.

Pesquisa de animais portadores — As primeiras tentativas para isolamento de leptospira em animais na cidade de Belém foram realizadas por DEANE², em 1947, que utilizou em suas pesquisas ratos capturados em residências localizadas em diversos bairros da cidade. O resultado que

obteve foi de 19,6% de ratos portadores de *L. icterohaemorrhagiae*, sendo a distribuição por espécies de ratos a seguinte:

	%
<i>Rattus norvegicus</i>	26,7
<i>Rattus rattus</i>	21,0
<i>Rattus alexandrinus</i>	13,6

Recentemente procuramos reservatórios silvestres pouco estudados no Brasil; são de vários animais, entre marsupiais (11), roedores (11), primatas (11) e pássaros (34) foram testados com vinte e quatro espécies de leptospira.

Em várias espécies de pássaros silvestres (34) de pequeno porte, capturados nas proximidades de Belém (Rodovia Belém-Mosqueiro), com auxílio de armadilhas colocadas a dois metros do solo, nenhum caso positivo foi constatado.

Os roedores silvestres pesquisados foram *Proechimys* sp. (10), procedentes da Serra do Navio (Território Federal do Amapá) e *Neacomys* sp. (1), capturado na mata

próxima a Belém. Apenas um exemplar de *Proechimys* revelou a existência de aglutininas para *L. panamá*, título 1/100.

Vários marsupiais de espécies diferentes — *Phillander opossum*, *Didelphis marsupialis* (8) e *Metachirus nudicaudatus* (1) foram testados; apenas em *Phillander opossum* encontramos anticorpos relacionados a *L. tarassovi* — título 1/200. Os marsupiais foram todos originários do Estado do Pará.

Entre os primatas investigados em diversas localidades do Estado do Pará citamos: *Alouatta belzebul* (1), *Saimiri* sp. (5), *Cebus* sp. (1), *Saguinus midas* (4).

Corrêa *et alii* em vinte bugios (*Alouata fusca*) capturados no Hórto Florestal de São Paulo encontrou sete com soro-aglutinação positiva para *L. javanica*, *L. djasiman* e *L. ballum*.

MINETTE⁵ publicou em 1966 completo estudo sobre leptospiroses em primatas.

Os resultados obtidos em primatas encontram-se discriminados no quadro II.

Q U A D R O I I

Sorotipos de leptospiroses encontrados no Estado do Pará e Território Federal do Amapá

Sorotipos	Títulos	Procedência	O C O R R Ê N C I A S					
			P r i m a t a s		R o e d o r e s		Marsupiais	
			Espécie	N.º	Espécie	N.º	Espécie	N.º
<i>L. tarassovi</i>	1/100	Estado do Pará	<i>Cebus</i> sp.	1	—	—	—	—
	1/200	Estado do Pará	—	—	—	—	<i>Phillander opossum</i>	1
<i>L. panamá</i>	1/100	Território do Amapá	—	—	<i>Proechimys</i> sp.	1	—	—
<i>L. grippotyphosa</i>	1/800	Estado do Pará	<i>Saimiri</i> sp.	1	—	—	—	—
<i>L. djasiman</i>	1/200	Estado do Pará	<i>Saguinus midas</i>	1	—	—	—	—

RESUMO

Foi confirmada a existência de leptose humana em Belém do Pará, com oito casos diagnosticados, seis dos quais produzida por *Leptospira icterohaemorrhagiae*, um por *L. canicola* e outro por *L. autra-*

lis A. Dois casos fatais por *L. icterohaemorrhagiae* foram assinalados.

Pesquisas sorológicas realizadas em animais silvestres resultaram negativas para trinta e quatro pássaros examinados. Fo-

ram encontrados resultados positivos para *L. panamá* em um exemplar de *Proechimis* sp., e para *L. tarassovi* em um espécimen de *Philander opossum* entre dez roedores e desessete marsupiais estudados respectivamente. Onze primatas foram igualmente investigados, sendo detectadas aglutininas antileptospira em *Cebus* sp. (*L. tarassovi*), *Saimiri* sp. (*L. grippotyphosa*) e *Saguinus midas* (*L. djasimani*).

Agradecimentos — Desejamos externar nossos agradecimentos à Seção de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pela valiosa contribuição na realização das sóro-aglutinações, e a Mr. Thomas E. Lovejoy — III-Dept. Biology, Yale University and Belém Ecology Project, Smithsonian Institution — pela gentileza em nos ceder soros de pássaros obtidos em seu programa de captura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CORREA, M. O. A.; HYAKUTAKE, S.; NATALE, V.; GALVAO, P. A. A. & AGUIAR, H. A. — Estudos sobre a *Leptospira wolffii* em São Paulo. Rev. Inst. Ad. Lutz 25/27:11-26, 1965/67.
2. DEANE, M. P. — Verificação da infecção natural de ratos por *Leptospira icterohaemorrhagiae* na cidade de Belém, Pará. Revta. Serv. Esp. Saúde Publ., Rio de J. 1(2):261-71, 1947.
3. ELKIS, H.; AMATO NETO, V. & MEIRA, J. A. — Transaminase glutâmico-oxalacética no soro de pacientes com leptospirose. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 4(4):217-9, 1962.
4. MAGALDI, C. — Incidência, prevalência e distribuição das leptospiroses no Brasil. Arq. Hig. Saúde Publ. 28:187-95, 1963.
5. MINETTE, H. P. — Leptospirosis in primates other than man. Amer. J. Trop. Med. 15(2):190-8, 1966.
6. REZENDE, M.; COSTA, C. A.; LOBAO, A. & MELO, G. B. — Primeiros casos de leptospirose diagnosticados sorologicamente em Belém (Pará-Brasil). Anais Inst. Med. Trop., Lisb. 23(1/2):245-7, 1966.

Recebido para publicação em 8 de setembro de 1969.

LEPTOSPIROSES NO RIO GRANDE DO SUL (1)
LEPTOSPIROSIS IN RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

EGOMAR LUND EDELWEISS (2)

SUMMARY

Experience of the author and others in human leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil, is related under the etiological, epidemiological and clinical aspects.

1. INTRODUÇÃO

Mede-se, geralmente, o domínio no conhecimento de uma zoonose pelo progresso realizado na investigação epidemiológica.

As leptospiras são parasitas de animais domésticos e selvagens e a leptospirose humana se mantém por intermédio desses hospedeiros, oriundos das mais diversas espécies.

2. HISTÓRICO

A pobreza do conhecimento sobre esta doença transmissível no extremo sul do país decorre da penúria das investigações epidemiológicas e a quase ausência de estudos da ecologia de seus reservatórios.

A primeira observação, realizada por SEFTON⁹ refere-se a uma pequena epidemia humana, ocorrida em 1938.

Só no ano de 1941, por ocasião de grande enchente que assolou o Rio Grande do Sul, COSTA² e sua equipe fizeram, então, para a época e região, estudo digno de ser mencionado. Conseguiram, de 45 casos tidos como doença de Weil, demonstrar, em onze, pelo exame do sedimento urinário, em quatro, através de inoculação em cobaio e em dois, pelo exame *post mortem*, a presença de leptospiras.

Mas a primeira comprovação sorológica do sorotipo causal surgiria somente em 1948 com o Prof. LOUZADA⁷ em um caso de leptospirose íctero-hemorrágica. Após isto, só em 1961 foi identificado por EDELWEISS⁴, o primeiro caso de febre canícola e, em 1963, o primeiro doente com soro-aglutinação positiva para *L. hebdomadis*.

3. EPIDEMIOLOGIA

3.1 — *Leptospirose animal*

Os estudos de leptospirose animal são mais pobres e tardios.

Neves da Silva *apud*⁶ fez os primeiros ensaios e conseguiu demonstrar a infecção em 15,1% dos ratos examinados em 1951. Utilizou a inoculação de macerado de rins, em cobaio, como método de investigação.

ESPÍRITO SANTO⁸ pesquisou a presença de aglutininas antileptospira em cães e encontrou 2,7% de infectados por *L. icterohaemorrhagiae*.

Investigação similar foi praticada por Vieira & Edelweiss que encontraram 6,7% de aglutininas anti-icterohemorrágica e/ou anticanicola.

(1) Trabalho apresentado ao Simpósio sobre Leptospiroses — Tema Oficial do V Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, realizado no Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da U.S.P., São Paulo, Brasil, de 23 a 26 de fevereiro de 1969.
(2) Professor da Faculdade Católica de Medicina, Porto Alegre. Livre Docente da Cadeira de Clínica de Doenças Tropicais e Infectuosas da Faculdade de Medicina de Porto Alegre da U.R.G.S.

QUADRO I

Resultados obtidos em estudos sobre Leptospirose animal no Rio Grande do Sul.

Animais estudados	Método empregado	Positividade		Investigadores
		Sorotipo	%	
Ratos	Inoculação de rins em cobaias	. . .	15,1	Neves da Silva
Cães	Sôro-aglutinação	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	2,7	Espírito Santo
Cães	Sôro-aglutinação	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	5,0	Vieira & Edelweiss
		<i>L. canicola</i>	1,7	

3.2 — Leptospirose humana

A análise levada a efeito por EDELWEISS⁵ (1962) em grupos profissionais ateu-se a lavradores de arrozais, magarefes, mineiros e trabalhadores em serviços de águas e esgotos. No primeiro destes grupos foram examinados 101 indivíduos, encontrando-se 3 casos positivos. O título considerado de positividade foi de 1:200. A investigação em magarefes revelou 3 casos de portadores de aglutininas antileptospira. Entre 60 mineiros, um apenas foi positivo para *L. copenhageni*.

Em trabalhadores de esgôto, em uma primeira investigação efetuada por EDELWEISS⁵, encontraram-se dois reatores positivos, dentre 86. Em uma segunda investigação, realizada por COSTA³ (1966) foram encontradas 20 sôro-aglutinações positivas; estas últimas, foram efetuadas com 23 sorotipos ao passo que as de Edelweiss, com apenas 6.

O título mínimo considerado positivo para COSTA³, foi de 1:100, enquanto que, para EDELWEISS⁵, foi de 1:200 (quadro II).

4. ESTUDOS CLÍNICOS

Indiscutivelmente, porém, como clínico, é mais sobre esta faceta do assunto a nossa experiência.

Queremos aqui relatar o exame de alguns casos de leptospirose que tivemos oportunidade de observar, ora em nosso serviço, ora no do Prof. Antônio Louzada, ou através de exames em que fomos convidados a participar nêstes últimos anos.

Podemos, no decorrer desse período, estudar 18 doentes de leptospirose diagnosticada pelo exame clínico, apoiado em provas laboratoriais inespecíficas e específicas, sobretudo, sôro-aglutinação.

O interessante é assinalar que não conseguimos ver nenhum dos doentes durante o período de invasão.

Todos nos chegaram com sua doença na fase de fastígio, alguns até em período de declínio.

Com exceção de um, eram portadores de formas com comprometimento hepatorenal com ou sem fenômenos meníngeos, clínicos ou humorais, independentemente do sorotipo causador.

E não se diga que não fizéramos, por exemplo, pesquisa nas meningites serosas não tuberculosas que baixaram nos nossos serviços. Apesar das investigações, tôdas elas, infelizmente, resultaram negativas. Apenas uma paciente, doente de ambulatório, revelou meningite frusta e sôro-aglutinação positiva.

QUADRO II

Investigações sorológicas em grupos profissionais

Grupos profissionais	N.º de examinados	POSITIVOS ENCONTRADOS			Investigador
		Sorotipos assinalados	Título mínimo	N.º de casos	
Lavradores de arrozal	101	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	1:200	2	Edelweiss (1962)
		<i>L. canicola</i>	1:200	1	
Magarefes	79	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	1:100	1	Edelweiss (1962)
		<i>L. icterohaemorrhagiae</i> + <i>canicola</i>	1:100	1	
		<i>L. canicola</i>	1:100	1	
Mineiros	60	<i>L. copenhageni</i>	1:200	1	Edelweiss (1962)
Trabalhadores em esgotos	86	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	1:200	1	Edelweiss (1962)
		<i>L. canicola</i>	1:200	1	
Trabalhadores em esgotos	104	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	1:100	6	Costa (1966)
		<i>L. icterohaemorrhagiae</i> + <i>copenhageni</i>	1:100	6	
		<i>L. icterohaemorrhagiae</i> + <i>australis</i>	1:100	1	
		<i>L. icterohaemorrhagiae</i> + <i>copenhageni</i> + <i>sentot</i>	1:100	2	
		<i>L. icterohaemorrhagiae</i> + <i>copenhageni</i> + <i>andamana</i>	1:100	1	
		<i>L. icterohaemorrhagiae</i> + <i>copenhageni</i> + <i>djasiman</i>	1:100	1	
		<i>L. wolffi</i>	1:100	1	
		<i>L. australis</i>	1:100	1	
<i>L. sentot</i>	1:100	1			

QUADRO III

Comprometimento sistêmico segundo o sorotipo causal

N.º	N.N.	Manifestações hepáticas	Manifestações renais	Manifestações meníngeas	Sorotipo provável determinante
1	L.S.L.	Presentes	Presentes	Presentes	<i>icterohaemorrhagiae</i>
2	P.S.A.	"	"	"	"
3	P.J.C.	"	"	"	"
4	O.S.R.	"	"	"	"
5	E.P.	"	"	"	"
6	V.A.T.	"	"	"	"
7	O.M.F.	"	"	Não registradas	"
8	A.S.	"	Ausentes	Ausentes	"
9	M.V.	"	Presentes	Não registradas	"
10	I.B.	"	"	"	"
11	S.T.	"	"	Ausentes	"
12	N.C.	"	"	Presentes	"
13	O.Q.	"	"	"	"
14	J.S.	"	"	"	"
15	F.T.	"	"	Não registradas	<i>copenhageni</i>
16	V.C.	"	"	Presentes	<i>hebdomadis</i>
17	A.T.	"	"	"	<i>canicola</i>
18	J.G.	Ausentes	Ausentes	"	<i>andamana</i>

O quadro III inspeciona doente por doente, face ao sorotipo determinante e às manifestações clínicas, por sistema, da doença.

Nêle, vê-se que a totalidade dos estudados, menos um, exibiu sintomatologia correspondente a comprometimento hepático. Concomitantemente, 16 entre 18, demonstraram lesões renais.

A grande maioria foi acometida por leptospirose causada pela *L. icterohaemorrhagiae*, mas houve também casos, provavelmente determinados pela *L. copenhageni*, *L. hebdomadis* e *L. canicola*, um para cada sorotipo.

As manifestações meníngeas, estiveram presentes em 12 pacientes e, dêles, um único não apresentava fenômenos hepáticos, em que o sorotipo descoberto foi a discutida *L. andamana*, cuja patogenicidade, foi, não há muito, novamente comprovada por CORRÊA¹.

A análise mais detalhada dêstes casos realizada no quadro IV não foge à sintomatologia já clássica.

Queremos apenas acentuar certos aspectos que estão freqüentemente presentes nesta doença.

Um dêles é o início brusco, constando principalmente de cefaléia, mal-estar, arrepios de frios e febre que se eleva rapidamente. Surpreende o paciente a qualquer momento do dia, no repouso ou no trabalho e segue-se de prostração tanto mais acentuada, quanto mais grave a doença.

Outro sintoma raramente ausente é o das mialgias. São tão freqüentes que podem ser consideradas obrigatórias. São inconfundíveis. Intensas e precoces, acompanham geralmente a curva térmica. Tanto espontâneas, como provocadas, têm sua sede preferencial nas panturrilhas, em nossa casuística, mas surgem também na região lombar, no dorso, no abdome.

A congestão conjuntival comparece nesta análise em 12 de 15 casos. Mais freqüente ainda seria, se os pacientes houvessem sido internados em fase mais precoce de sua doença. Acompanha-se, no início, de ardência nos olhos e fotofobia, mas nenhuma ou muito pouca secreção.

QUADRO IV

Análise de sintomas, sinais e dados laboratoriais de 18 casos de leptospirose

Manifestação mórbida	Casos analisados	Casos positivos
Início súbito	18	15
Hipertemia acima de 38°C	18	13
Mialgias	18	16
Congestão conjuntival	15	12
Discordância pulso-temperatura	16	6
Hemorragias de um ou mais tipos	18	15
Adenopatias	18	10
Albuminúria	18	16
Hiperazotemia	15	8
Icterícia	18	17
Provas funcionais hepáticas positivas	18	17
T.G.O. e/ou T.G.P. elevadas	12	10
Seromucóides elevados	12	10
Hemossedimentação aumentada	17	17
Neutrofilia sanguínea	16	8
Líquor xantocrômico	14	12
Outros achados no líquido	14	6
Letalidade	18	1

A discordância entre o pulso e a temperatura, em que a frequência daquele não se eleva em nível correspondente ao da hipertermia, ocorreu em 6 de 16 casos passíveis de análise.

Surgem ainda como manifestações frequentes, as pequenas hemorragias, que até muitas vezes passam despercebidas ao paciente se não se lhes chama a atenção. Ocorrem sob a forma de epistaxes, escarros sanguíneos, pequenas hematemeses, sufusões conjuntivais, etc.

Embora geralmente se diga que nas leptospiroses as adenopatias não são frequentes, elas aparecem aqui em 10 casos sobre 18. Foram porém sempre de pouca expressão, tanto pelo seu volume quanto pela extensão da área comprometida.

Nossa experiência, baseada, sobretudo, em formas hepato-renais tende a valorizar a importância das manifestações clínicas e humorais do comprometimento do fígado e do rim.

A albuminúria foi, também aqui, a figura mais habitual do sofrimento renal. Conquanto não atingisse cifras muito elevadas, estendeu-se muitas vezes até a convalescença.

Em 8 de 15 casos que mereceram a pesquisa houve retenção azotêmica de grau variável. Em um dos pacientes que se recuperou, a taxa de uréia sanguínea atingiu 414 mg%.

A icterícia foi o sinal clínico mais em evidência. Aumentou rapidamente até atingir um máximo que se manteve durante a fase aguda da doença. Depois tendeu a diminuir lentamente.

No caso de desenlace fatal, continuou intensa até a morte.

As provas funcionais hepáticas foram positivas em 17 de 18 pacientes. No soro de 12 pacientes encontramos, em 8, elevação das T.G.O. e T.G.P. que nunca ultrapassou 80 unidades, aumento da globulina gama em 11, e taxas acima do normal de globulina alfa-2, em 6.

As mucoproteínas séricas foram de alta valia no diagnóstico pois se apresentaram quase que constantemente elevadas, enquanto que em nossa casuística a sedimentação globular sempre esteve anormalmente acelerada desde o início da evolução até o declínio da doença.

Menos constante nos pareceu a neutrofilia sanguínea. Deu-nos um suporte ao diagnóstico diferencial a presença de xantocromia do líquido, dado de bastante valor quando demonstrado na fase inicial das manifestações clínicas.

O único falecimento ocorrido deu-se por azotemia decorrente das lesões renais.

Para o diagnóstico laboratorial de nossos casos de leptospirose, usamos de preferência a soro-aglutinação; em 9, experimentamos o exame de sedimento urinário em campo escuro; em 7, empregamos a inoculação do sedimento urinário em cobaio. No único êxito letal, houve comprovação necroscópica.

QUADRO V

Diagnóstico específico empregado em 18 pacientes com leptospirose

Pacientes \ Prova diagnóstica	Sêro aglutinação	Exame direto do sedimento urinário	Inoculação do sedimento urinário em cobaia	Necropsia
Examinados	18	9	7	1
Positivos	18	1	2	1

O exame direto do sedimento urinário só nos deu resultado positivo em um caso, em que o exame foi realizado quase que imediatamente após a emissão e centrifugação da urina.

A inoculação em cobaia proporcionou resultados um pouco melhores, embora ainda deficientes.

A sêro-aglutinação demonstrou ser a

prova mais prática e eficaz para o diagnóstico. Traz ainda a vantagem de indicar com razoável grau de probabilidade a identidade do sorotipo causal.

Últimamente temos utilizado, para êste método, 23 sorotipos pertencentes a 16 dos sorogrupos reconhecidos no Relatório Técnico nº 380 (1967), do Grupo de Técnicos em Leptospirose da O.M.S.⁸

QUADRO VI

Sorotipos usados nas sêro-aglutinações

Sorogrupo	Sorotipo	Cepa
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGa
	<i>icterohaemorrhagiae</i>	N 3294 (Corréa)
	<i>copenhageni</i>	M 20
<i>Javanica</i>	<i>javanica</i>	Veldrat Batavia 46
<i>Canicola</i>	<i>canicola</i>	Hond Utrecht IV
<i>Ballum</i>	<i>castellonis</i>	Castellón 3
<i>Pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>	Salinem
<i>Cynopteri</i>	<i>cynopteri</i>	3522 C
<i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>	Akiyami A
	<i>sentot</i>	Sentot
	<i>djasiman</i>	Djasiman
<i>Australis</i>	<i>australis</i>	Ballico
<i>Pomona</i>	<i>pomona</i>	Pomona
<i>Grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>	Moskva V
<i>Hebdomadis</i>	<i>hebdomadis</i>	Hebdomadis
	<i>wolffi</i>	3705
	<i>sejroe</i>	M 84
	<i>saxkoebing</i>	Mus 24
<i>Bataviae</i>	<i>bataviae</i>	Swart
<i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>	Mitis Johnson
<i>Panama</i>	<i>panama</i>	CZ 288
<i>Semarangia</i>	<i>patoc</i>	Patoc 1
<i>Andamana</i>	<i>andamana</i>	CH 11

Não empregamos, por não possuí-los, nenhum dos sorotipos dos sorogrupos *Celledonii* nem *Shermani*.

Como bem acentua aquêles relatório, forçoso é reconhecer que a prova microscópica de sôro-aglutinação é, apenas, relativamente sôro-específica. As aglutininas reveladas pelas leptospiroses de um sorotipo muitas vêzes aglutinam sorotipos correlatos, especialmente se forem do mesmo sorogrupos, mesmo em altos títulos.

Estudos de absorção com o sôro do indivíduo infectado poderão proporcionar, em muitos casos, um diagnóstico do sorotipo com alta probabilidade de acêrto.

Mas o sorotipo somente poderá ser determinado, com certeza, pelo isolamento e identificação da leptospira causadora da doença.

Como isto, na maioria dos casos, é para nós utópico, temos que contentar-nos com os achados clínicos e de laboratório ao nosso alcance, até conseguirmos melhorar nosso padrão médico e educacional.

RESUMO

O autor relata sua própria experiência e a de outros pesquisadores em leptospiroses humanas no Rio Grande do Sul sob os aspectos etiológico, epidemiológico e clínico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CORREA, M. O. A.; HYAKUTAKE, S.; NATALE, V.; TIRIBA, A. C. & GALVÃO, P. A. A. Leptospiroses humanas ainda não assinaladas no Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 6(2):71-4, 1964.
2. COSTA, B.; FAILLACE, J. M.; CUNHA, C. V.; SILVA, N. N.; CLAUSELL, D. T.; CHAVES, A. & MEDINA, H. — Estudos de uma epidemia de Espiroquetose ictero-hemorrágica em Pôrto Alegre. Archos. Dep. Est. Saude, Pôrto Alegre (R. Grande do Sul) 3:7-40, 1942.
3. COSTA, E. A. — Investigação epidemiológica de leptospiroses em trabalhadores do Departamento Municipal de Água e Esgotos de Pôrto Alegre. Pôrto Alegre, Fac. Cat. Med. Pôrto Alegre, 1966. Tese (dout.) Fac. Cat. Med. Pôrto Alegre.
4. EDELWEISS, E. L. — Sôbre um caso de febre canícola. Nota prévia. Rev. Med. Rio Grande do Sul 17:205, 1961.
5. EDELWEISS, E. L. — Leptospiroses humanas (contribuição ao seu estudo). Pôrto Alegre, Globo, 1962. Tese (livr. doc.) — Fac. Med. Pôrto Alegre.
6. ESPÍRITO SANTO, J. — Da existência de Leptospira em *Canis familiaris*, Linnaeus, na Cidade de Pôrto Alegre. Pôrto Alegre, Edit. Coruja [s.d.].
7. LOUZADA, A. — Espiroquetose ictero-hemorrágica. Rev. Med. Rio G. Sul 4:212, 1948.
8. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE — Problèmes actuels des recherches sur la leptospirose. Rapport d'un Group d'experts de l'OMS. Genève, O.M.S., 1967. Sér. Rapp. Techn. 380.
9. SEFTON, B. — Leptospirose ictero-hemorrágica. Subsídios aos estudos feitos no Brasil. Rev. Méd. Bahia 6:63-75, 1938.

Recebido para publicação em 8 de setembro de 1969

LEPTOSPIROSE COM SÔRO-AGLUTINAÇÃO POSITIVA PARA *LEPTOSPIRA JAVANICA* EM BÔCA DO ACRE, AMAZONAS

HUMAN LEPTOSPIROSIS BY *LEPTOSPIRA JAVANICA* IN BÔCA DO ACRE, AMAZONAS, BRAZIL

EDUARDO AZEREDO COSTA ⁽¹⁾
MARCELO OSWALDO ÁLVARES CORRÊA ⁽¹⁾
VAIL NATALE ⁽²⁾
TERUÊ SADATSUNE ⁽²⁾

SUMMARY

Human leptospirosis by *Leptospira javanica* in two patients from Bôca do Acre, Amazonas, Brazil, was detected by means of sorroagglutination tests.

INTRODUÇÃO

Durante o ano de 1967, um dos autores (E.A.C.) esteve chefiando a Unidade Sanitária de Bôca do Acre da Fundação S.E.S.P.

Sendo êsse município localizado na região sudoeste do Estado do Amazonas, onde apenas as endemias de maiores proporções são conhecidas, resolvemos estar atentos a possíveis casos de doenças ditas tropicais sôbre as quais não se tivessem quaisquer dados.

Assim, algumas amostras de sôro foram enviadas para o Instituto Adolfo Lutz em São Paulo onde, pelos demais autores, foram efetuadas provas para a identificação de anticorpos específicos para leptospirose e toxoplasmose.

Em apenas uma oportunidade foi detectado um título significativo (1:8 000) pela prova da imunofluorescência indireta para o diagnóstico da toxoplasmose; tratava-se

de uma criança de um ano onde predominava um quadro de adenomegalia generalizada. As condições de comunicação do local e o largo tempo que separou a consulta do resultado dos exames, além de outras dificuldades facilmente imagináveis num trabalho em uma região dessas, impediram-nos um estudo mais detalhado do caso.

Em relação à leptospirose assinalamos que no sôro de um paciente icterico encontramos um título de 1:100 para *L. panamá*, porém perdemos contato com êste paciente.

Limitar-nos-emos, portanto, à ocorrência de leptospirose com sôro-aglutinação positiva para *L. javanica* que, com várias falhas em sua apreciação pelas razões já expostas, permitiu-nos um estudo algo melhor que acreditamos de valor, face à inexistência absoluta de dados, na região, sôbre o assunto.

Vale ainda dizer que encontramos apenas três referências bibliográficas acusando a presença de leptospirose no Estado do Ama-

(1) Da Fundação do Serviço Especial de Saúde Pública.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

zonas. São do trabalho de MATA⁴, publicado em 1919, no qual o autor relata a observação de casos hospitalizados em Manaus com quadro de Weil e presença de leptospiros na urina, o de Strong, publicado em 1926, ao qual não tivemos acesso e o de Stimson referido por SEFTON⁵ publicado em 1938.

Na referida publicação que intitulou de "Leptospirose ictero-hemorrágica" (subsídio aos estudos feitos no Brasil), Sefton diz textualmente à pag. 63:

"É de interesse histórico observar que Stimson, em 1910, examinando tecidos de amarílicos na cidade de Manaus, assinalou a presença de um microorganismo com aspecto de espiroqueta a que deu o nome de *S. interrogans*, denominação sugerida pela forma semelhante a um ponto de interrogação, atitude freqüentemente assumida pelo germe nas preparações coradas pelo Levaditi.

Posteriormente, membros da expedição Hamilton Rice observaram no Amazonas que raças brasileiras do *L. icteroides* causavam em cãesinhos infecção letal, caracterizada por icterícia, hemorragia, notadamente do tubo gastro-intestinal, com vômito negro, e intensa nefrite."

Não conseguimos determinar através de qual publicação Sefton tomou conhecimento daquele achado de Stimson porém o interessante é que, em 1907, Stimson, examinando cortes histológicos corados pelo método de Cajal-Levaditi, do rim de um paciente falecido em 1905 durante um surto epidêmico de febre amarela em New Orleans, U.S.A., encontrou um microorganismo semelhante a um espiroqueta ao qual denominou (*Spirochaeta*) *interrogans*. Em 1940 SELLARDS⁶ publica: "The interpretation of *Spirochaeta interrogans* of Stimson (1907) in the light of subsequent developments", no qual demonstra à sociedade que o referido microorganismo era uma leptospira, a primeira à qual havia sido dado o nome específico *interrogans* que deveria pois integrar o nome correto da assim chamada *L. icterohaemorrhagiae* que passaria a ser *Leptospira interrogans* (Stimson, 1907), emend. Wenyon, 1926. Aliás, este

conceito foi proposto pelo "Taxonomic Subcommittee on Leptospira"⁷, reunido em Montreal em Agosto de 1962, através do seguinte texto:

"The Subcommittee recommended that the genus *Leptospira* be divided into two species: *L. interrogans* representing parasitic strains, and *L. biflexa*, saprophytic strains".

Ora, em 1910 Stimson encontrou, pois, a mesma *Leptospira interrogans* em tecidos de pacientes vitimados na Amazônia pela febre amarela, ou melhor, pela leptospirose que freqüentemente determina um quadro clínico semelhante ao da febre amarela, justificando plenamente o erro diagnóstico baseado em dados exclusivamente clínicos. Foi pois Stimson o primeiro a encontrar a leptospira em doente na Amazônia.

Em Paris, na reunião de 12 de março de 1919 da "Société de Pathologie Exotique", Matta apresentou comunicação intitulada "Sur la spirochetose hépato-rénale: spirochetose ictero-hémorragique et son traitement", na qual informa que:

"Il serait logique pour cela, à mon avis, d'appeler *spirochetose hépato-rénale* la maladie d'INADA et IDO, ce qui concorderait avec l'opinion de CHAUFFARD, qui considère la maladie comme une hépato-néphrite aigüe et fébrile, á rechutes fréquentes."

Des auteurs japonais et allemands croient que cette spirochetose se confond avec la maladie de WEILL. D'autres, au contraire, jugent que celle-ci doit être considérée comme une maladie distincte, parce qu'elle présente un symptôme différent: la splénomégalie.

J'ai vu dans l'Amazone plusieurs cas de maladie de WEILL. Le premier fut observé dans l'hôpital de la Misericórdia à Manaus, sur Joseph C.R., em mars 1907 (n^o 864). Le diagnostic fut établi d'après les travaux de LANCEREAUX et de VALLASSOPOULO. Chez tous mes malades, je rencontrai une splénomégalie et une hépatomégalie, plus ou moins accentuée, mais jamais de splénomégalie seule.

M'en reportant aux travaux de CHAUFARD, LANDOUZY et autres, j'abandonnai le diagnostic de maladie de WEILL. La découverte de INADA et IDO et les études et observations de SARRAILHÉ, FRUGON, CANNATA, NORESCHI, CARPI, RENAUX, BENCZUR, CASTELLANI, SAMPIETRO et beaucoup d'autres m'ont donné une nouvelle orientation. L'examen de l'urine m'a d'ailleurs éclairé à ce sujet.

Au Brésil, le premier cas de spirochétose hépato-renal ou ictero-hémorragique appartient, il me semble à A. Mac-Dowell (Pará)".

Mais adiante (pag. 130), resumindo a observação de J.P., deixa bem claro que o diagnóstico foi baseado no encontro de leptospira na urina:

"J.P... 57 ans, Portugais, habitant Manaus, entra à l'infirmerie dans mon service à l'hôpital de la Misericórdia. Antécédents sans importance. Symptômes principaux: fièvre 38,4; ictere généralisé; cephalée; vomissements; pouls fréquent, mou, déprimé; douleurs musculaires, principalement aux mollets. Urine avec albumine bile et cylindres, 840 cm₃ dans les 24 heures. Asthénie. Examen microscopique de l'urine avec le Giemsa, *Spirocheta ictero-hemorragiae* positif".

OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

Caso 1 — Em 18 de abril de 1967 recebemos, na Unidade Sanitária da F.S.E.S.P. em Bôca do Acre, Amazonas, o paciente J. R.M., branco, nascido no município em 16-6-21, seringueiro e residente no lugar chamado Santa Rita, no mesmo município.

Referia êle um quadro "gripal", febril, que persistia há doze dias. Há mais tempo acusava tosse e expectoração esbranquiçada. Nos dois últimos dias aparecera urina escura como café fraco, mas não houvera diminuição do fluxo urinário. Constipação e dor abdominal eram as outras queixas. Relatou também que, periódicamente, fazia caçadas na mata, onde era obrigado a atravessar igapós, sendo que a última de-

las antecedeu de uma semana, aproximadamente, o início da doença.

Ao exame físico apresentava os seguintes dados positivos: conjuntivas oculares ictericas com sufusões hemorrágicas; manchas acrômicas de limites nítidos e contornos irregulares com alguma atrofia (apresenta tais lesões há mais de vinte anos tendo elas sido primariamente descamativas) nos membros inferiores e superiores; estertores crepitantes, roncantes e sibilantes disseminados em ambos os campos pulmonares; fígado palpável a três polpas digitais abaixo da reborda costal na linha hemiclavicular direita.

Caso 2 — Dois meses após o achado do *Caso 1*, em 14-6-67, atendemos, na mesma Unidade Sanitária, o paciente G.B.S., pardo, natural do município, nascido em 27-9-55, residente em Fortaleza, localidade situada entre Bôca do Acre e Santa Rita, na mesma margem do Rio Acre.

Relatava o paciente, seringueiro, que há sete dias iniciara-se sua doença, com febre, e dores musculares generalizadas. Há um dia apresentava prostração e colúria. Referiu que devido ao seu trabalho seguidamente penetrava na mata, onde se fazia necessário atravessar igapós. Ao exame físico apresentava conjuntivas oculares sub-ictéricas e fígado palpável dois dedos abaixo da reborda costal na linha hemiclavicular direita.

ACHADOS LABORATORIAIS

Caso 1 — Pesquisa de BAAR no escarro: negativa. Exame comum de urina: cor — amarelo citrino; densidade — 1008; reação — ácida; albumina — positivo (+ +); glicose — negativo; sedimento — raras células epiteliais de descamação, piócitos (5 por campo), cilindros granulosos finos (2 na lâmina examinada); hemácias — 5 por campo; raros cristais de ácido úrico, pequeno depósito de uratos amorfos e raras bactérias. Soro-aglutinação para leptospirose: a) amostra de 18-4-67: positiva para *L.ballum* (1:400), *L. djasimani* (1:400), *L. andamana* (1:400), *L. javanica* (1:400) e *L. habdomadis* (1:200). b) amostra de 14-6-67 (clínicamente curado): positiva para *L. javanica* (1:200). c) Amostra de 19-9-67: negativa. Essas

sôro-aglutinações, analisadas à luz do conhecimento que temos do comportamento sorológico nas leptospiroses, permitem considerar com ampla margem de segurança a *L. javanica* como agente etiológico do caso em tela.

Caso 2 — Exame comum de urina: côr — amarelo ouro; densidade — 1022; reação — neutra; albumina — positiva (+ +); glicose — negativa; sedimento — raras células epiteliais de descamação, piócitos (média de 1/campo), freqüentes cristais de ácido úrico, raros cristais de fosfato amoniacomagnesiano, ligeiro depósito de uratos amorfos e raras bactérias. *Sôro-aglutinação para leptospirose:* amostra de 14-6-67 (única): positiva para *L. javanica* (1:200).

TERAPEUTICA

Ambos os casos foram tratados no dia da primeira consulta com Penicilina e Aspirina. O *Caso 1* só retornou ao serviço dois meses depois, quando mandamos chamá-lo, já que estávamos de posse do resultado da sôro-aglutinação. Nessa oportunidade, afirmou que dez dias após estava curado, executando suas tarefas habituais. Com o *Caso 2*, perdemos todo o contato, desconhecendo portanto sua evolução.

QUADRO I

Leptospiras usadas como antígeno

SOROTIPO	AMOSTRA PADRAO
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	RGA
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	M 20
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	N 3294
<i>L. grippityphosa</i>	Moskva V
<i>L. canicola</i>	Hond Utrecht IV
<i>L. pomona</i>	Pomona
<i>L. australis</i>	Ballico
<i>L. bataviae</i>	Swart
<i>L. sefrøe</i>	M 84
<i>L. pyrogenes</i>	Salinem
<i>L. tarassovi</i>	Mitis Johnson
<i>L. sazkoebing</i>	Mus 24
<i>L. andamana</i>	CH 11
<i>L. autumnalis</i>	Akiyami A
<i>L. djasiman</i>	Djasiman
<i>L. sentot</i>	Sentot
<i>L. wolffii</i>	3705
<i>L. javanica</i>	Veldrat Batavia 46
<i>L. hebdomadis</i>	Pasteur
<i>L. panama</i>	CZ 288

OBSERVAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

a) *Descrição do local*

Santa Rita está situada à margem direita do Rio Acre, sendo o maior núcleo populacional nesta margem (cêrca de 30 casas) já que cêrca de 10 casas se encontram defronte, na margem esquerda. Dista três horas de "motor" de Bôca do Acre, rio acima. Fortaleza situa-se na mesma margem, porém bem mais próximo de Bôca do Acre. Esta última é a sede do Município amazonense de mesmo nome, situada na confluência dos rios Acre e Purus.

O clima é tropical, havendo duas estações do ano bem definidas: o dito verão, que se estende de abril a outubro, época com raríssimas chuvas, em que os rios baixam muito de nível, e o inverno, que coincide com as chuvas e inundações. A temperatura média é de 28°C.

Especialmente na época em que se inicia o verão, encontram-se os igapós, na mata, que são banhados de água estagnada (note-se que isso coincide com a época do aparecimento dos casos).

b) *Fauna*

Cuidaremos apenas de referir os animais que poderiam vir a ter alguma relação com o problema, destacando os mais encontrados: macacos, gato maracajá, cotia, anta, paca, porco do mato, veado, répteis, morcegos, aves e ratos, bem como outros roedores. Como animais domésticos, cães e porcos.

c) *Outros dados*

Em relação ao problema, restaria ainda referir o tipo de habitação na qual não existem paredes externas, sendo, pois, os indivíduos expostos a animais noturnos. A alimentação depende fundamentalmente de caça e pesca, sendo estas, razões para penetração na mata. Outra delas, é a extração do látex, o que obriga a internações diárias, o que também ocorre na safra de castanha.

Caso 1 (J.R.M.)



Fig. 1 — A família



Fig. 2 — O paciente. Observem-se lesões de “pinta” no pulso esquerdo.



Fig. 3 — A residência

d) *Leptospira javanica*

Numa rápida revisão bibliográfica encontramos uma já extensa lista de hospedeiros da *L. javanica*. Entretanto, sempre em trabalhos na Ásia.

Não encontramos referências do isola-

mento, nem mesmo de diagnóstico sorológico de casos clínicos dessa leptospirose, nas Américas.

Em inquéritos sorológicos, foram encontrados soro-aglutininas para *L. javanica*, uma vez, na Bolívia¹ e outra, no Brasil².

QUADRO II

Hospedeiros de *Leptospira javanica* apud 3

Ratos e camundongos	<i>R.r. diardi</i> — <i>R. norvegicus</i> <i>R. argentiventer</i> — <i>R. exulans</i> <i>R. concolor</i> — <i>R. brevicandus</i>
Mamíferos insetívoros	<i>Tupia glis</i>
Pássaros	<i>Pycnonotus</i> sp.
Répteis	<i>Acrochordus javanicus</i>
Cães	<i>Canis familiaris</i>
Gatos	<i>Felis domestica</i>

e) *Pesquisa nos comunicantes*

Entre os familiares do *Caso I*, foram feitas pesquisas sorológicas. Nenhuma delas foi positiva. Os soros dos pacientes que atendíamos, procedentes do mesmo local, em cêrca de 50 amostras, foram testados, sendo todos negativos.

f) *Pesquisa nos prováveis reservatórios*

Não foi realizada por não termos estrutura que a possibilitasse.

CONCLUSÕES

1. O presente trabalho revela, ao que tudo indica, os primeiros casos de leptospirose por *L. javanica* confirmados sorolôgicamente no Estado do Amazonas.
2. Êsse achado vem reforçar a idéia da necessidade de se contar com centros capazes de executar sêro-reações específicas para diagnóstico das leptospiroses e propiciar condições para investigações epidemiológicas.
3. Pela variedade de espécies animais, já conhecidas como hospedeiros, e pelas características geográficas, a região amazônica é uma área onde a leptospirose deve ser investigada.

RESUMO

São relatados dois casos humanos de leptospirose por *L. javanica*, oriundos de Bôca do Acre, Amazonas, comprovados através das provas de sêro-aglutinação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, A. D. — The distribution of Leptospirosis in Latin America. Bull. Wld. Hlth. Org. 23:113-25, 1960.
2. HYAKUTAKE S.; CORRÊA, M. O. A.; NATALE, V.; COUTO, M. C.; MAZZARI, R. & PACHECO, A. — Inquérito sorológico para o diagnóstico de leptospiroses entre cortadores de cana de açúcar de alguns municípios do Estado de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz 25/27: 111-4, 1965/67.
3. HULL T. — Diseases transmitted from animals to man. 5th. ed. Springfield, Ill., Charles & Thomas, 1963.
4. MATA, A. — Sur la spirochétose hépato-rénale (spirochétose ictero-hémorragique) et son traitement. Bull. Soc. Path. Exot. 12:128-32, 1919.
5. SEFTON, B. — Leptospirose ictero-hemorragica (Subsídio aos estudos feitos no Brasil). Rev. Méd. Bahia 6(4):63-75, 1938.
6. SELLARDS, A. W. — The interpretation of (? *Spirochaeta*) *interrogans* of Stimson (1907) in the light of subsequent developments. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg 33(5):545-8, 1940.
7. TAXONOMIC SUBCOMMITTEE ON LEPTOSPIRA — Int. Bull. Bact. Nomencl. Taxon 13(3):161-5, 1963.

Recebido para publicação em 10 de setembro de 1969

NOVE ANOS DE LEPTOSPIROSE NO INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO (*)

NINE YEARS OF LEPTOSPIROSIS AT THE INSTITUTO BIOLÓGICO OF SÃO PAULO, BRAZIL

CARLOS ALMEIDA SANTA ROSA
ANTONIO FERNANDO PESTANA DE CASTRO
ANTONIO SERGIO DA SILVA
JULIETA MYIA TERUYA

SUMMARY

The authors report in this paper the studies on Leptospirosis at the Biological Institute of São Paulo — Brazil, from January 1960 to December 1968.

Positive sero-reactions for various serotypes of leptospires were found in 23.6% of cattle sera (titer 1/200 or higher), 19.5% of swine sera (titers until 1/409,600) and 22.8% of equine sera. In horses was also observed a correlation of symptoms of ophtalmia with leptospiral agglutinins in five cases. In sheep, 39.8% were positive and in dog, 14%.

A table shows the total of sera tested in nine years in all species. In tables are: the results of the tests in cattle; the results in swine, and the results of sero reactions in equine, sheep and dog sera.

Along the sero reactions many isolations were done in that period. The results are expressed in a table.

Os primeiros trabalhos sôbre leptospirose em animais domésticos do Brasil foram de DACORSO FILHO⁴ e de AZEVEDO & SANTOS¹, ambos na década de 1940 e relacionados com estudos em cães.

No Instituto Biológico de São Paulo, foi Vicente O. Guida o primeiro pesquisador a interessar-se pelo assunto, tendo realizado inúmeros estudos principalmente nas espécies domésticas de valôr econômico^{5, 6, 7}. Depois dêle, outros planos foram encetados e outros dados foram conseguidos. É sôbre êles que versa êste relato de um trabalho que vai de janeiro de 1960 a dezembro de 1968, nêste campo. São apresentados aqui, informalmente, não sômente os resultados de estudos sorológicos como ainda o número de cepas que se conseguiu isolar no citado período.

Assim, o quadro I mostra o número de soros examinados em nove anos, num total de 21 263, com uma taxa de positividade de 22,4%, dentre várias espécies animais, inclusive o homem. Embora os estudos relativos à espécie humana sejam de atribuição do Instituto Adolfo Lutz, durante o período em aprêço 916 soros foram trazidos ao laboratório, enviados por médicos amigos. Muitos dêles vieram de fora do Estado de São Paulo.

Pelos dados apresentados nêste quadro, vê-se que o maior número de soros testados foi de bovinos, com 23,6% de positivos e com uma predominância do sorotipo *Wolffi*. Êste sorotipo foi incluído em nossa bateria de antígenos depois de seu isolamento de um paciente, do Hospital Emílio

(*) Trabalho apresentado ao Simpósio sôbre Leptospiroses — Tema Oficial do V Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, realizado no Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da U.S.P., São Paulo, Barsil, de 23 a 26 de fevereiro de 1969.

Ribas, por CORRÊA *et alii*³. Daí para cá ele passou a predominar nos resultados dos testes feitos com soros de bovinos. Antes

havia uma predominância do sorotipo *pomona*, conforme veremos adiante na análise de outros resultados.

QUADRO I

Soros examinados para diagnóstico de Leptospirose, no período de janeiro de 1960 a dezembro de 1968

Espécie animal	S O R O S				
	Examinados n.º	Positividade		Predominância	
		n.º	%	sorotipo	%
Bovina	15 080	3 561	23,6	<i>wolffi</i>	53,3
Suína	3 242	697	19,5	<i>pomona</i>	54,6
Humana	916	54	5,8	<i>icterohaemorrhagiae</i>	70,3
Equina	811	185	22,8	<i>pomona</i>	36,7
Ovina	481	143	29,7	<i>canicola</i>	39,8
Canina	426	60	14,0	<i>icterohaemorrhagiae</i>	75,0
Caprina	277	76	27,4	<i>canicola</i>	35,5
Bubalina	30	5	16,6	<i>wolffi</i>	60,0
<i>Total</i>	21 263	4 781			
Positividade %	22,4				

Depois dos bovinos, foram os suínos os animais domésticos mais trabalhados em sorologia para Leptospirose, em um total de 3 242 amostras de soros com uma taxa de positivos de 19,5%, tendo em primeiro lugar o sorotipo *pomona*. Seguem-se as outras espécies, sendo que, de felinos, foram examinados apenas 3 amostras de soros, com dois positivos, sendo um para o sorotipo *saxkoebing* e outro, para *pyrogenis*.

No quadro II vêm-se os testes de sôro-aglutinação em bovinos, com a enumeração dos antígenos e os respectivos títulos. O mais elevado que se encontrou durante este período de trabalho, nesta espécie, foi 1/25 600 para *pomona* em um caso, seguido de 1/12 800 para *wolffi* em três casos. Ao todo já foram detectados anticorpos em bovinos para treze sorotipos diferentes no Estado de São Paulo. Em muitas das propriedades de onde eram oriundos os soros de bovinos, havia problemas de reprodução,

tais como abortos, repetição de cio, infertilidade que, como se sabe, podem ser causados por leptospira.

Os testes feitos em soros de suínos estão analisados no quadro III. Nesta espécie, o maior título encontrado foi 1/409 600 para o sorotipo *pomona*, em uma fêmea que havia abortado e da qual se isolou leptospira. Em suínos, até o momento, já se encontraram aqui anticorpos para nove sorotipos diferentes, tendo como predominante *pomona* (54,6%).

Pelo quadro IV pode-se analisar em conjunto o número de soros positivos para os equinos, ovinos e caninos. Nos equinos, num total de 811 examinados, a taxa de positivos foi de 22,8%, sendo o sorotipo *pomona* o mais encontrado (36,7%), seguido de *canicola* e de mais três outros sorotipos diferentes. Em alguns casos de soros positivos para *pomona*, houve corre-

QUADRO II

Titulos dos soros de bovinos positivos no teste de sêro-aglutinação microscópica com vários sorotipos como antígenos (período 1960/68)

Antígenos	Diluições do sêro								Total
	1/200	1/400	1/800	1/1.600	1/3.200	1/6.400	1/12.800	1/25.600	
icterohaemorrhagiae	175	41	15	2	2	1	0	0	236
canicola	92	23	11	3	2	4	0	0	135
pomona	339	100	56	39	38	9	1	1	583
grippotyphosa	104	30	8	0	0	0	0	0	142
tarassovi (hyos)	135	131	83	43	24	3	0	0	419
sejroe	10	1	0	0	0	0	0	0	11
australis	9	5	3	0	1	0	0	0	18
bataviae	7	0	1	1	0	0	0	0	9
mini	52	8	0	5	0	0	0	0	65
ballum	10	0	0	0	0	0	0	0	10
wolffi	730	470	358	201	118	36	3	0	1.916
panama	1	2	0	0	0	0	0	0	3
pyrogenis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
javanica	0	0	0	0	0	0	0	0	0
autumnalis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
butembo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
brasiliensis	4	0	6	3	1	0	0	0	14
Total	1.668	811	541	297	186	53	4	1	3.561

SANTA ROSA, C. A.; CASTRO, A. F. P.; SILVA, A.S. & FERREIRA, J.M. — Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 29/30: 19-27, 1969/70.

QUADRO III

*Títulos dos soros de suínos positivos no teste de sêro-aglutinação com vários sorotipos como antígenos
(período de 1960 a 1968)*

Antígenos	Diluições dos séros												
	1/200	1/400	1/800	1/1.600	1/3.200	1/6.400	1/12.800	1/25.600	1/51.200	1/102.400	1/204.800	1/409.600	Total
icterohaemorrhagiae	46	8	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	56
canicola	34	16	7	9	2	2	0	0	0	1	0	0	71
pomona	274	75	70	35	33	17	16	8	9	2	0	1	540
grippotyphosa	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
tarassovi (hyos)	12	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	16
sejroe	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
australis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
bataviae	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
mini	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
ballum	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
wolffi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
panama	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pyrogenis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
javanica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
autumnalis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
butembo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
brasiliensis.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	379	102	78	45	37	19	16	8	9	3	0	1	697

QUADRO IV

Número de soros positivos para Leptospirose em diversas espécies animais no período de 1960 a 1963

Espécies	S o r o t i p o s										Total
	Título	<i>ictero</i>	<i>canícola</i>	<i>pomona</i>	<i>grippo</i>	<i>tarassovi</i>	<i>sejroe</i>	<i>australis</i>	<i>bataviae</i>	<i>pyrogenis</i>	
Equina (811)	1/200	15	44	59	14	—	18	—	—	—	150
	1/400	4	7	12	—	—	3	—	—	—	26
	1/800	—	3	1	—	—	1	—	—	—	5
	1/1600	1	1	—	—	—	—	—	—	—	2
	1/3200	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1
	1/6400	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>Total</i>		20	56	73	14	—	22	—	—	—	185
Ovino (481)	1/200	29	49	27	1	1	15	—	1	—	123
	1/400	1	5	8	—	—	—	—	—	—	14
	1/800	—	1	4	—	—	—	—	—	—	5
	1/1600	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>Total</i>		30	56	39	1	1	15	—	1	—	143
Canina (426)	1/200	15	4	1	—	1	2	1	1	1	26
	1/400	12	3	—	—	—	—	—	—	—	15
	1/800	10	1	—	—	—	—	—	—	—	11
	1/1600	4	—	—	—	—	—	—	—	—	4
	1/3200	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
	1/6400	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
	1/12800	2	—	—	—	—	—	—	—	—	2
<i>Total</i>		45	8	1	—	1	2	1	1	1	60

SANTA ROSA, C. A.; CASTRO, A. F. P.; SILVA, A.S. & FERREIRA, J.M. — Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 29/30: 19-27, 1969/70.

QUADRO V

Número de reações positivas para Leptospirose em soros humanos, no período de 1960 a 1968

Espécie	Reação Título	Sorotipos					Total
		<i>icterohaemorrhagiae</i>	<i>canicola</i>	<i>pomona</i>	<i>grippotyphosa</i>	<i>tarassovi</i>	
Humana	1/200	11	3	1	2	—	17
	1/400	17	1	1	—	—	19
	1/800	8	—	—	—	—	8
	1/1600	4	—	—	—	—	4
	1/3200	1	—	—	—	1	2
	1/6400	2	—	—	—	—	2
	1/12800	2	—	—	—	—	2
<i>Total</i>		45	4	2	2	1	54

lação com sintomas de oftalmia periódica nos cavalos, o que confirma mais uma vez a etiologia da doença nesta espécie. Nos ovinos, embora o problema não seja de muita relevância, a taxa de positivos encontrada foi relativamente alta (29,7%). O sorotipo mais encontrado foi *canicola* (39,8%) e o título mais elevado foi de 1/1 600. Em cães, de 426 examinados, 14% foram positivos com a predominância do sorotipo *icterohaemorrhagiae* (75%).

Anticorpos de outros sorotipos, porém, foram encontrados.

Em soros humanos, tal como mostra o quadro 5, os títulos encontrados foram até 1/12 800, com um número maior de positivos para o sorotipo *icterohaemorrhagiae*, seguido dos sorotipos *canicola*, *pomona*, *grippotyphosa*, e *tarassovi* — antiga *hyos* — em um caso (quadro V).

O método usado em tôdas as reações sorológicas acima mencionadas foi a soroaglutinação microscópica, em tubo, usando-se várias cepas de leptospira como antígenos. Inicialmente eram usados apenas oito sorotipos: 1) *icterohaemorrhagiae*,

2) *canicola*, 3) *pomona*, 4) *grippotyphosa*, 5) *tarassovi* (*hyos*), 6) *sejroe*, 7) *australis*, 8) *bataviae*. Eram usadas com adição de formol. Atualmente, e desde 1963 que, segundo a recomendação do grupo da O.M.S., são usadas cepas vivas, com idade de crescimento entre quatro e quatorze dias. A composição da bateria de antígenos atualmente usada no Instituto Biológico, está demonstrada no quadro VI.

Embora os trabalhos de Leptospirose no Biológico se restrinjam quase que somente à área do Estado de São Paulo, muitos soros foram enviados de outros estados para o laboratório, afim de serem testadas para leptospirose. O quadro VII mostra o número de soros recebidos, bem como o número de positivos e respectivas percentagens.

Ao lado das reações sorológicas, muitas tentativas de isolamento foram feitas, partindo-se de material variado, tendo-se conseguido os resultados expressos no quadro VIII.

QUADRO VI

Sorogrupo	Sorotipo	Cepa
1. <i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>copenhageni</i>	M 20
2. <i>Canicola</i>	<i>canicola</i>	Hond Utrecht IV
3. <i>Pomona</i>	<i>pomona</i>	Pomona
4. <i>Grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>	Moskva V
5. <i>Tarassovi</i>	<i>guidae</i>	RP 29
6. <i>Hebdomadis</i>	<i>sawajizak</i>	Szwajizak
	<i>wolffi</i>	3705
7. <i>Australis</i>	<i>australis</i>	Ballico
8. <i>Bataviae</i>	<i>bataviae</i>	Van Tienen
	<i>brasiliensis</i>	LT 966
9. <i>Ballum</i>	<i>castellonis</i>	Castellón 3
10. <i>Panama</i>	<i>panama</i>	CZ 214 K
11. <i>Pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>	Salinem
12. <i>Javanica</i>	<i>Javanica</i>	Veldrat Bat. 46
13. <i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>	Akyami A
14. <i>Cynopteri</i>	<i>butembo</i>	Butembo
15. <i>Semaranqa</i>	<i>patoc</i>	Patoc I

QUADRO VII

Soros examinados para Leptospirose, por Estados, no periodo de 1960 a 1968

Estados	SOROS		
	Examinados	Positividade	
	n.º	n.º	%
São Paulo	20 100	4 402	21,9
Paraná	344	87	25,2
Pernambuco	249	32	12,8
Minas Gerais	243	75	30,8
Goiás	147	23	15,6
Rio Grande do Sul	61	12	19,6
Amapá	60	39	65,0
Paraá	39	7	17,9
Rio de Janeiro	20	4	20,0
<i>Total</i>	21 263	4 781	
Positividade %	22,4		

QUADRO VIII

Cepas de *Leptospira* isoladas no período de 1960 a 1968

Espécie animal	Leptospiras isoladas		Material de origem	Procedência
	n.º	Cepa		
Homem	2	<i>icterohaemorrhagiae</i>	Sangue	Capital
Bovino	1	<i>icterohaemorrhagiae</i>	Feto	Capital
Bovino	1	<i>wolffi</i>	Rins	Interior (?)
Suíno	3	<i>pomona</i>	Feto	Araraquara
Suíno	1	<i>canicola</i>	Rins	Interior
Suíno	1	<i>icterohaemorrhagiae</i>	Rins	Assis
Suíno	4	<i>tarassovi (hyos guidae)</i>	Rins	Marília
Suíno	1	<i>pomona</i>	Urina	Campinas
Suíno	2	<i>pomona</i>	Rins	Interior
Suíno	1	<i>icterohaemorrhagiae</i>	Feto	Capital
<i>Total</i>	17			

A cepa *icterohaemorrhagiae*, de bovino, foi isolada de um feto, em um caso de aborto.

A cepa *icterohaemorrhagiae*, de bovino, foi isolada de um feto, em um caso de aborto, num pequeno rebanho perto da Capital; a *pomona*, isolada da urina de uma porca, numa criação onde havia um surto de aborto. As *tarassovi (hyos)*, *ictihaemorrhagiae* e *canicola*^{2, 10}, isolados de rins de suínos abatidos em matadouro, demonstram a condição destes animais como portadores de leptospiras, embora estejam aparentemente normais. As demais, constantes do quadro 7, fazem parte de trabalhos em fase de conclusão. Além disto foi tipificada no laboratório uma cepa recebida de Recife, cepa humana, que inicialmente se mostrou como *tarassovi* mas que, na sua tipificação final, foi classificada como sorotipo *alexii* do sorogrupo *pyrogenis*. Animais silvestres também foram trabalhados para verificação de sua condição de portador, tendo-se até o momento isolada 27 cepas dentre ratos, camundongos e gambás. Todas estão sendo tipificadas e fazem parte de uma tese. Também foram trabalhados 60 morcegos — *Desmodus*

rotundus; não se conseguiu o isolamento mas, na soro-aglutinação, 5 soros foram positivos, sendo 3 para *canicola* e 1 para *pyrogenes*. Dos mesmos, seis rins foram positivos em cortes histológicos e um deles provinha de um dos morcegos positivos para o sorotipo *canicola*.

RESUMO

Foram relatados os trabalhos sobre Leptospirose realizados no Instituto Biológico de São Paulo, no período de janeiro de 1960 a dezembro de 1968. Durante o período foram examinados 21 263 soros, com uma taxa de positividade de 22,4%, dentre várias espécies animais, inclusive o homem. O maior número de soros testados foi de bovinos, com 23,6% de positivos e com uma predominância do sorotipo *wolffi*, em três casos, aglutinando a 1/12 800. O título maior, porém, foi visto em um soro que aglutinou a 1/25 600 para o sorotipo *pomona*. Em suínos, a taxa de positividade foi de 19,5%, tendo em primeiro lugar o sorotipo *pomona*, sendo que o maior título encontrado foi de 1/409 600. Em equinos encontraram-se 22,8% de positivos predominando também

pomona; nêles foi vista também uma correlação entre soros positivos e oftalmia periódica. Em ovinos predominou o sorotipo *canicola* e a taxa de positivos foi de 39,8%, enquanto que em caninos foi de 14% na maioria dos casos para *icterohaemorrhagiae*.

Foram apresentados, em cinco quadros demonstrativos, detalhes dos resultados; em outro quadro, o número de soros recebidos de outros Estados, bem como número de positivos e respectivas percentagens.

Ao lado das reações sorológicas, muitas foram as tentativas de isolamento. O número de cepas isoladas, assim como os sorotipos encontrados e sua origem foram demonstrados em quadro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AZEVEDO, A. G. & SANTOS, J. A. — Sobre a ocorrência de Leptospirose no Rio de Janeiro. 3.º Congr. Bras. Med. Vet. Porto Alegre. Porto Alegre, Barcelos Botase, 1946. p. 115-163.
2. CASTRO, A. F. P.; SANTA ROSA, C. A. & CALDAS, A. D. — Isolamento de *L. canicola* de suínos abatidos em matadouro. Archos. Inst. Biol., S. Paulo 29:193-7, 1962.
3. CORRÊA, M. O. A.; HYAKUTAKE, S.; NATALIE, V.; GALVAO, P. A. A. & AGUIAR, H. A. — Estudos sobre a *Leptospira wolfii* em São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz 25/27:11-25, 1965/67.
4. DACORSO FILHO, P. — Leptospirose canina. Hospital, Rio de J. 18(5):797-809, 1940.
5. GUIDA, V. O. — Ocorrência de leptospiros em animais domésticos em São Paulo, Brasil. Archos. Biol. Tecnol., Curitiba 7:9-20, 1952.
6. GUIDA, V. O.; CINTRA, M. L.; SANTA ROSA, C. A.; CALDAS, A. D.; CORRÊA, M. O. & NATALE, V. — Leptospirose suína provocada pela *L. canicola*, em São Paulo. Archos. Inst. Biol., S. Paulo 26:49-54, 1959.
7. GUIDA, V. O.; SANTA ROSA, C. A.; D'APICE, M.; CORRÊA, M. O. & NATALE, V. — Pesquisa de aglutininas anti-leptospira no sêro de bovinos do Estado de São Paulo. Archos. Inst. Biol., S. Paulo 26:109-17, 1959.
8. SANTA ROSA, C. A.; CASTRO, A. F. P. & TROISE, C. — Isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae* de bovino em São Paulo. Archos. Inst. Biol., S. Paulo 28:113-8, 1961.
9. SANTA ROSA, C. A.; CASTRO, A. F. & TROISE, C. — Isolamento de *Leptospira pomona* de suíno em São Paulo. Archos. Inst. Biol., S. Paulo 29:165-74, 1962.
10. SANTA ROSA, C. A.; CASTRO, A. F. & CALDAS, A. D. — Isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae* e *Leptospira hyos* de suínos abatidos em matadouro. Archos. Inst. Biol., S. Paulo 29:285-92, 1962.

Recebido para publicação em 28 de outubro de 1969.

LEPTOSPIROSES EM SÃO PAULO⁽¹⁾

LEPTOSPIROSIS IN SÃO PAULO, BRAZIL

MARCELO OSWALDO ÁLVARES CORRÊA⁽²⁾

SUMMARY

From 1947 to 1968 samples of sera from 12.172 patients with presumptive diagnosis of leptospirosis were tested by agglutination. One thousand two hundred and two out 1349 positive samples reacted with *Leptospira icterohaemorrhagiae* and 147 with other leptospire.

INTRODUÇÃO

Nossa experiência no setor das leptospiroses humanas teve início em janeiro de 1947 quando, dispondo dos elementos necessários para o seu diagnóstico laboratorial no Instituto Adolfo Lutz, iniciamos a pesquisa sistemática dos casos de leptospiroses humanas no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo onde, então, também trabalhávamos.

Até então os casos conhecidos entre nós eram escassos e apresentados como raridade científica. Assim é que, em meados de 1929, PIZA & GOMES⁸ relataram o primeiro caso de moléstia de Weil em São Paulo, o primeiro também no Brasil com reprodução experimental da infecção em cobaio e conseqüente achado de leptospiras em cortes histológicos de rim do animal. Lembraram-se então os autores de paciente falecido com suspeita de febre amarela, o qual havia trabalhado dentro das águas do rio Tietê e comunicaram suas suspeitas ao Prof. Rocha Lima que, em novos cortes histológicos de rim do paciente, encontrou leptospiras, firmando pois o diagnóstico retrospectivo de leptospirose.

Em 1933 GOMES⁹ relata outros dois casos, um com inoculação em cobaio positiva para leptospira, outro com isolamento da leptospira a partir da inoculação de sangue do paciente. Em 1940, PRADO⁹ relata um caso e finalmente em janeiro de 1947 iniciou-se em São Paulo, no Instituto Adolfo Lutz e no Hospital das Clínicas, o estudo sistemático das até então consideradas raríssimas leptospiroses. Já em abril de 1947, CORRÊA *et alii*² apresentaram nota preliminar referente ao estudo clínico e laboratorial de doze casos de leptospiroses diagnosticados em apenas quatro meses de pesquisas.

Em 1949, CORRÊA & MEIRA³ apresentaram o primeiro caso humano, relatado no Brasil, de febre canícola.

Em 1950, GOMES, CORRÊA & JORDÃO⁷ apresentaram ao 5º Congresso Internacional de Microbiologia, realizado em agosto de 1950 no Rio de Janeiro, os resultados dos estudos efetuados em 146 pacientes suspeitos de leptospiroses, provenientes em sua maioria do Hospital das Clínicas: 45 amostras de sôro foram po-

(1) Apresentado ao Simpósio sobre Leptospiroses — Tema oficial do V Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, realizado no Instituto de Medicina Tropical da F. M. U. S. P. São Paulo, Brasil, de 23 a 28 de fevereiro de 1969.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

sitivas, nas provas de sôro-aglutinação, sendo 44 para *L. icterohaemorrhagiae* e 1 para *L. canicola*.

Inoculações em cobaio proveniente de 77 pacientes demonstraram a existência de leptospira em 5 casos, sendo 3 pelo exame de cortes histológicos dos rins dos cobaios inoculados; nos outros dois casos foram isoladas e identificadas *L. icterohaemorrhagiae*.

As estirpes então utilizadas como antígenos nas provas de sôro-aglutinação foram as seguintes: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. pomona*, *L. bataviae*, *L. sejroë* e *L. zanoni*.

Seria fastidioso enumerar os resultados dos exames efetuados a partir de 1951 até a data atual; preferimos focalizar os resultados obtidos nos últimos cinco anos, isto é, de 1964 a 1968, particularmente porque êste período se situa após a realização do 7º Congresso Internacional de Medicina Tropical e de Malariologia, onde estivemos em contato pessoal com alguns

expoentes do estudo das leptospiroses, tais como Alexander, Babudieri, Kitaoka, Caccione etc.

Os pacientes provêm em sua maioria absoluta do Hospital do Isolamento Emilio Ribas sendo os restantes do Serviço de Moléstias Infeciosas e de outras enfermarias do Hospital das Clínicas, do Serviço de Moléstias Transmissíveis do Hospital dos Servidores, e alguns, raros, de outras fontes. Os dados expostos a seguir se referem ao grande São Paulo, não figurando nem dados do interior do Estado, nem dados de outros Estados. O método utilizado como processo diagnóstico foi o da sôro-aglutinação em placa, utilizando-se como antígenos as culturas formoladas dos diversos sorotipos de leptospiroses até início de 1967 quando passamos a utilizar as culturas vivas não mais imobilizadas pelo formol. O título mínimo considerado diagnóstico foi de 1:200. A composição da bateria de antígenos utilizada no Instituto Adolfo Lutz foi a seguinte:

Sôro-grupo	Sôro-tipo	Cepa de referência
1 <i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGa
	<i>copenhageni</i>	M 20
2 <i>Canicola</i>	<i>canicola</i>	Hond Utrecht IV
3 <i>Pomona</i>	<i>pomona</i>	<i>Pomona</i>
4 <i>Grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>	Moskva V
5 <i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>	Mitis Johnson
6 <i>Hebdomadis</i>	<i>hebdomadis</i>	<i>Hebdomadis</i>
	<i>wolffi</i>	3705
	<i>sejroë</i>	M 84
	<i>saxkoebing</i>	Mus 24
7 <i>Australis</i>	<i>australis</i>	Ballico
8 <i>Bataviae</i>	<i>bataviae</i>	Swart
9 <i>Ballum</i>	<i>Castellonis</i>	Castellón 3
10 <i>Panama</i>	<i>panama</i>	CZ 214 K
11 <i>Pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>	Salinem
12 <i>Javanica</i>	<i>javanica</i>	Veldrat Batavia 46
13 <i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>	Akiyami A
	<i>djasiman</i>	<i>Djasiman</i>
	<i>sentot</i>	<i>Sentot</i>
14 <i>Cynopteri</i>	<i>cynopteri</i>	3522 C
15 <i>Semarangae</i>	<i>patoc</i>	<i>Patoc</i> I
16 <i>Andamana</i>	<i>andamana</i>	CH 11

Atualmente integra a bateria o sôro-grupo *Shermani* cepa LT 821.

No quadro I estão expostos ano por ano,

de 1964 a 1968, o número de casos suspeitos, ou seja, enviados para exame, dentro de critério clínicos e epidemiológicos mais ou

menos constantes. Na 3.^a coluna figura o número de casos negativos e, a seguir, o número de casos positivos com as respectivas porcentagens em relação ao número de casos suspeitos com oscilações de 9,3 a

16,4%, com a média de 13,7%, mostrando pequenas variações e confirmando a constância dos critérios de “suspeitas de leptospirose”.

QUADRO I

Porcentagem de positividade de sêro-aglutinações em casos suspeitos de leptospirose

Ano	Casos			
	Suspeitos n.º	Negativos n.º	Positivos	
			n.º	%
1964	823	747	76	9,3
1965	1 248	1 072	176	14,1
1966	1 582	1.378	204	12,7
1967	1.545	1.291	254	16,4
1968	1 388	1 191	197	14,1
TOTAIS	6 586	5 679	907	Média % 13,7

Desde logo chamam a atenção as elevadas cifras de casos positivos — 76, 176, 204, 254 e 197 — totalizando 907, em 5 anos.

Tais cifras são realmente elevadas particularmente quando nos lembramos dos dados publicados em outros Estados, escassos, e de cifras muito baixas. É certo que uma população de mais de 8 milhões de habitantes corresponde ao grande São Paulo mas o mais certo é que aqui se pensa em leptospirose diante dos doentes e que aqui se pode fazer o diagnóstico. Estamos convencidos de que a doença existe

em todo o país; o que é necessário é pensar em termos de leptospirose e poder confirmar a suspeita clínica através de recursos laboratoriais. Aliás, foi exatamente isto que aconteceu entre nós em 1947, conforme expusemos no início.

O quadro II evidencia a distribuição dos casos positivos entre as diferentes leptospirosas, ano por ano, de 1964 a 1968, patentando o absoluto predomínio da *L. icterohaemorrhagiae* à qual correspondem 89,75% dos casos, ficando os restantes 10% distribuídos por outras leptospirosas, conforme é demonstrado no quadro.

QUADRO II

Distribuição dos casos de leptospiroses humanas em São Paulo diagnosticadas no Instituto Adolfo Lutz de 1964 a 1968

Ano	Casos positivos		TOTAL
	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	Outras leptospirosas	
1964	62	14	76
1965	158	18	176
1966	189	15	204
1967	228	26	254
1968	177	20	197
TOTAIS	814	93	907
Porcentagem (%)	89,75	10,25	100

Acentuemos todavia que o predomínio de determinado tipo de leptospira varia de país para país e, certamente, de região para região, num país imenso como o nosso. Por exemplo, no Chile e Rumania predomina a *L. pomona*, na Alemanha a *L. grippotyphosa*, na Austrália a *L. australis*.

QUADRO III

Discriminação dos casos de "outras leptospiroses"

Sêro-tipo	Nº casos
<i>L. canicola</i>	23
<i>L. andamana</i>	12
<i>L. pomona</i>	11
<i>L. sentot</i>	5
<i>L. wolffi</i>	5
<i>L. panama</i>	5
<i>L. hebdomadis</i>	4
<i>L. autumnalis</i>	4
<i>L. ballum</i>	4
<i>L. grippotyphosa</i>	3
<i>L. javanica</i>	3
<i>L. djasiman</i>	3
<i>L. australis</i>	3
<i>L. cynopteri</i>	2
<i>L. bataviae</i>	2
<i>L. pyrogenes</i>	2
<i>L. sakkoebing</i>	1
<i>L. tarassovi</i>	1
Total	93

Na incidência das assim denominadas "outras leptospiroses" ocupa o primeiro lugar a *L. canicola* com 23 casos a propósito da qual em 1963 foi apresentado por AMATO NETO *et alii*¹ um trabalho: "Leptospirose canicola: verificações em tórno de um surto ocorrido em localidade próxima a São Paulo (Capital)".

O segundo lugar é ocupado pela controvertida *L. andamana*, com 12 casos. Como é sábio, a *L. andamana* foi colocada pelo Subcomitê de Taxonomia das Leptospiroses da O.M.S., em 1962, entre as leptospiroses saprófitas, não patogênicas (*L. biflexa*), em virtude de seu comportamento frente a determinadas provas tais como: crescimento em presença de sais de cobre, intensidade da reação da oxidase, crescimento em meio com 8-azaguanina, falta de patogenicidade para cobaios, testes da lipase etc. O referido Subcomitê chegou mesmo a admitir que a única cêpa de *L. andamana* — a chamada CH 11 — existente nas diferentes coleções de leptospiroses dos Laboratórios de Referência não fôsse a original, isolada por Taylor e Goyle, em 1930, nas ilhas Andaman. Acontece que, em 1963, CORRÊA *et alii*² isolaram do liquor de um paciente que veio a falecer, tal a gravidade de sua doença, uma leptospira que nas provas preliminares se comportou como sendo a *L. andamana*, conforme relataram ao VII Congresso Internacional de Medicina Tropical e Malariologia. Restava ainda fazer as provas finais de absorção e aglutinação cruzadas entre a cêpa isolada e a CH 11, o que foi feito por Kitaoka do Laboratório de Referências de Tokyo, demonstrando a absoluta identidade entre ambas. Em nosso modo de vêr, cai por terra a alegação de que a *L. andamana* CH 11 não seria a original isolada por Taylor e Goyle. Em trabalho apresentado a êste mesmo Congresso relatamos uma série de outros casos de leptospirose humana por *L. andamana*.

Em terceiro lugar comparece a *L. pomona* com 11 casos, depois a *L. sentot* a *L. wolffi* e a *L. panama* com 5 casos cada uma, esta última constituindo-se em novo sêro-tipo de recente isolamento e agora assinalada entre nós. A respeito da *L. wolffi* CORRÊA *et alii*³, em 1966, relataram o isolamento dessa leptospira do liquor de um paciente e os resultados de levantamento sorológico então efetuado. A *L. wolffi* até então só fôra encontrada no sudoeste da Ásia.

QUADRO IV

Incidência mensal, em São Paulo, dos casos de leptospirose humanas, durante o período de 1964 a 1968

Meses	N.º de Casos				
	1964	1965	1966	1967	1968
Janeiro	7	15	19	23	15
Fevereiro	3	34	32	45	44
Março	11	33	47	42	29
Abril	7	15	24	24	22
Maió	4	9	21	14	7
Junho	4	8	10	8	14
Julho	3	10	2	13	18
Agosto	4	7	6	4	12
Setembro	5	3	8	7	7
Outubro	9	9	11	12	5
Novembro	6	15	7	21	18
Dezembro	13	18	18	20	6

O Quadro IV mostra a distribuição mensal, ano por ano, das leptospirose em São Paulo, evidenciando a maior incidência nos meses de maior precipitação de chuvas — fevereiro e março — o que se visualiza melhor no gráfico 1 que é a projeção gráfica dos números exibidos no quadro.

Existem pequenas variações de ano para ano nos demais meses, porém o gráfico 2 exibe a incidência média mensal de 1964 a 1968, demonstrando a já clássica distribuição conhecida entre nós.

No quadro V resumimos a incidência das leptospirose desde 1947 a 1963 e de 1964 a 1968, período que focalizamos com maior detalhe. Os totais são eloquentes demonstrando sempre que as leptospirose humanas existem, sempre existiram, o problema é pensar em sua existência e provê-se dos meios necessários ao seu diagnóstico.

É certo que a realização das provas de soro-aglutinação exige equipamento, técnica e experiência adequados para que o seu

manuseio seja eficaz, sobresaindo a dificuldade em manter numerosos sorotipos de leptospiras, de exigentes necessidades culturais. Na prática diária, uma das maneiras de contornar tais dificuldades consiste no uso da *Leptospira semaranga* Patoc I como antígeno de triagem. Com efeito, a *L. semaranga* Patoc I é dotada de tal capacidade antigênica, que aglutina, funcionando como antígeno polivalente, com a maioria das soro-aglutininas das leptospiras patogênicas.

O quadro VI demonstra a eficácia da *L. semaranga* Patoc I, como antígeno de triagem, quando confrontada com as leptospiras patogênicas na execução das reações de soro-aglutinação rotineiras e traduz o resultado de quatro anos, 1965-1968, de experimentação efetuada na Seção de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz.

Finalmente no quadro VII exibimos as leptospiras isoladas de pacientes, fazendo constar a data, o material de onde foram isoladas e a cêpa identificada.

GRÁFICO 1

Incidência mensal em São Paulo dos casos de leptospiroses humanas, ano por ano, de 1964 a 1968

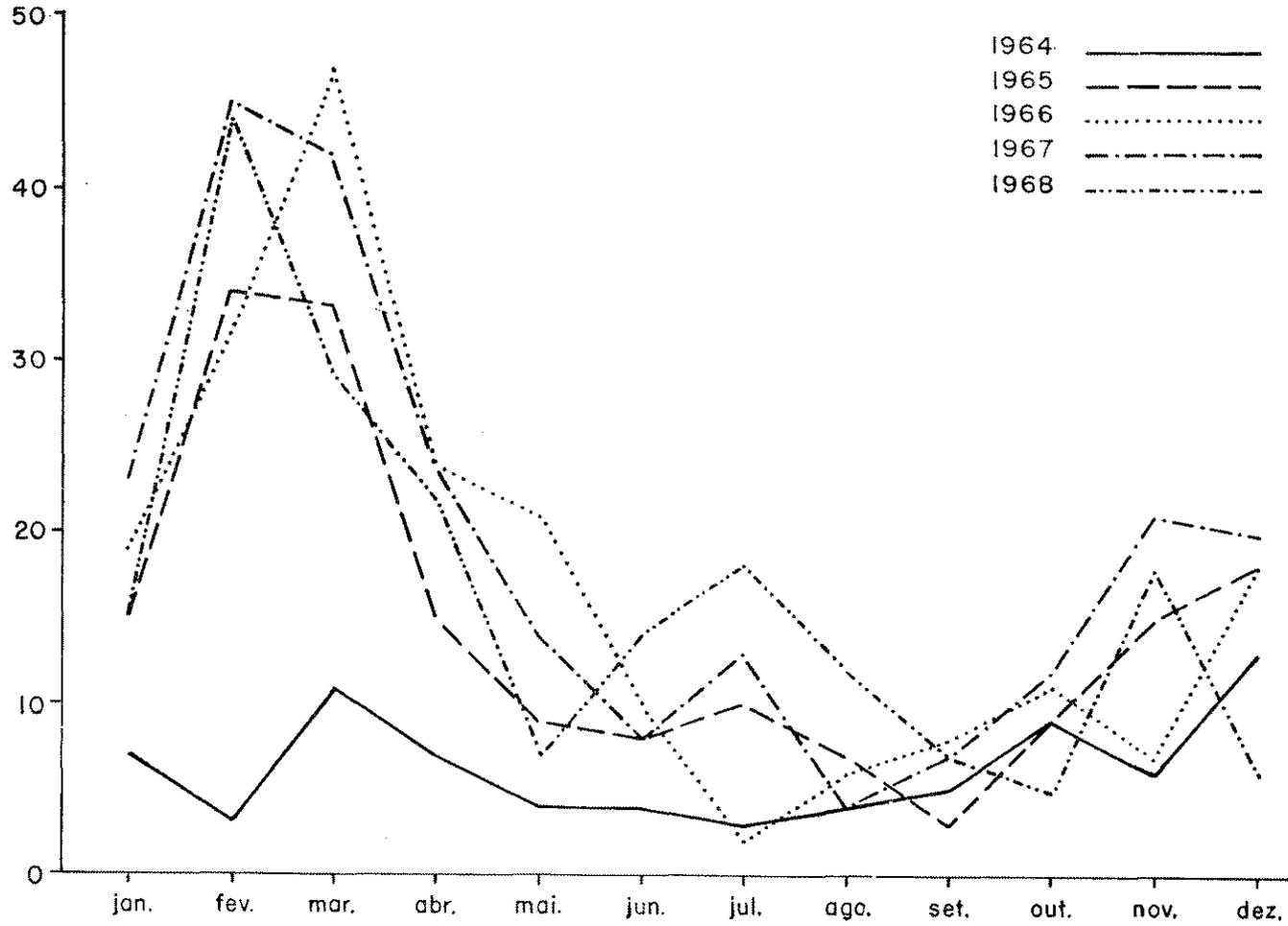
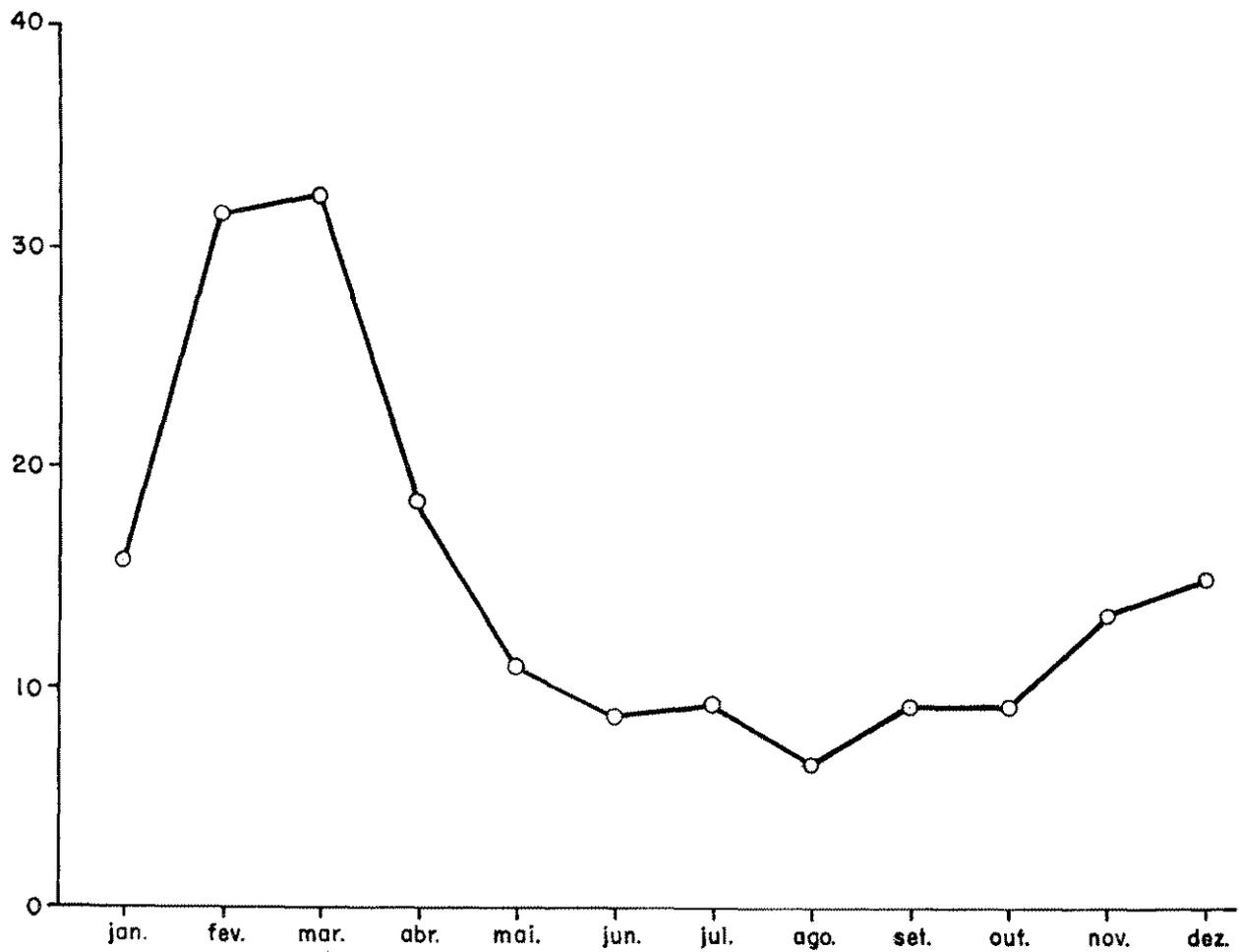


GRÁFICO 2

Incidência mensal em São Paulo dos casos de leptospiroses humanas — 1964 a 1968



QUADRO V

Resultados das sêro-aglutinações de 1947 a 1963

Período de tempo	Número de casos				
	Suspeitos	Negativos	Positivos		
			<i>L. ictero-haemorrhagiae</i>	Outras leptospirosas	Total
1947 a 1963	5 586	5 144	388	54	442
1964 a 1968	6 586	5 679	814	93	907
TOTAL	12 172	10 823	1 202	147	1 349
Porcentagem (%)	100	88,9	9,8	1,3	

QUADRO VI

Eficácia da *L. semaranga* Patoc I, como antígeno de triagem

	Soros para leptospiroses		Total	Porcentagem (%)
	Negativos	Positivos		
Concordância	4 914	956	5 870	98,78
Discordância	18	54	72	1,22
TOTAL	4 932	1 010	5 942	100,00

QUADRO VII

Leptospiras isoladas de pacientes

Data	Nome Paciente	Material	Identificação	Cêpa
16. 4.1948	A.N.	sangue	<i>L. ictero-haemorrhagiae</i>	<i>Nicolini</i>
26. 2.1950	S.S.	sangue	<i>L. ictero-haemorrhagiae</i>	<i>Sebastião</i>
11. 2.1962	B.A.S.	rim	<i>L. ictero-haemorrhagiae</i>	N 3 294
30. 6.1963	E.R.S.	liquor	<i>L. andamana</i>	<i>Corrêa</i>
14.10.1965	D.A.M.	liquor	<i>L. wolffi</i>	<i>Divaldo</i>
6. 4.1966	A.B.O.	sangue	<i>L. ictero-haemorrhagiae</i>	244-I.A.L.
7. 6.1966	A.P.A.	sangue	<i>L. ictero-haemorrhagiae</i>	313-I.A.L.
2.12.1966	A.C.J.	sangue	<i>L. ictero-haemorrhagiae</i>	<i>Cecília</i>
12. 8.1968	D.B.	sangue	<i>L. ictero-haemorrhagiae</i>	272-I.A.L.

É óbvio que é pequeno o número das amostras isoladas em relação às cifras diagnósticas que até aqui exibimos, o que se deve a fatores tais como:

a) Os pacientes procuram o Hospital raramente em fase septicêmica e o fazem em geral já medicados com penicilina à qual a leptospira é muito sensível.

b) Fatores de entrosamento entre os hospitais e o Instituto Adolfo Lutz tornam quase nula a solicitação de hemoculturas.

RESUMO

Este trabalho condensa a experiência no diagnóstico das leptospiroses humanas da Seção de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz.

De 1947 a 1968 foram examinadas amostras de 12.172 casos suspeitos de leptospiroses, através da prova de sôro-aglutinação, dos quais 1.349 resultaram positivos, sendo 1.202 causados pela *Leptospira icterohaemorrhagiae* e 147, por outras leptospiroses. Foi demonstrada, ademais, a eficácia de *L. semaranga Patoc 1* como antígeno de triagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMATO NETO, V.; MAGALDI C.; CORRÊA, M. O. A.; GOMES, M. C. O. & GALIZA, I. — Leptospirose canícola: verificações em torno de um surto ocorrido em localidade próxima a São Paulo (Capital). Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 5(6):265-70, 1963.
2. CORRÊA, M. O. A.; PINHEIRO, D.; PATRÍCIO, L. D. & MEIRA, J. A. — Moléstia de Weil em São Paulo. Rev. Paul. Med. 30:359-61, 1947.
3. CORRÊA, M. O. A. & MEIRA, J. A. — Sobre um caso de febre canícola no homem. Rev. Med. Cir. S. Paulo 9(4):185-202, 1949.
4. CORRÊA, M. O. A.; HYAKUTAKE, S.; NATALE, V.; GALVÃO, P. A. & AGUIAR, H. C. — Leptospiroses humanas ainda não assinaladas no Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 6(2):71-4, 1964.
5. CORRÊA, M. O. A.; HYAKUTAKE, S.; NATALE, V.; GALVÃO, P. A. & AGUIAR, H. C. — Estudos sobre a *Leptospira wolffi* em São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 25/27:11-26, 1965/67.
6. GOMES, L. S. — *Leptospira icterohaemorrhagiae* (Inada e Ido) isolada de um caso de moléstia de Weil. Brasil Méd. 47:280-1, 1933.
7. GOMES, L. S.; CORRÊA, M. O. A. & JORDÃO, F. M. — Incidência das leptospiroses humanas em São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz 10:93-110, 1950.
8. PIZA, J. T. & GOMES, L. S. — Moléstia de Weil em S. Paulo (nota prévia). Ann. Paul. Med. Cir. 21:23-32, 1930.
9. PRADO, A. A. — Icterícia espirochética benigna. Diagnóstico patogênico e etiológico. Rev. Med. 24:(84):15-32, 1940.

Recebido para publicação em 4 de dezembro de 1969

AVALIAÇÃO DO SUCO DE LARANJA EM REFRESCOS, CONCENTRADOS E OUTROS PRODUTOS DERIVADOS ⁽¹⁾

CHEMICAL DETERMINATION OF ORANGE JUICE IN REFRESHMENTS, CONCENTRATED AND OTHER DERIVATIVE PRODUCTS

WALDOMIRO PREGNOLATTO ⁽²⁾

MYRNA SABINO ⁽²⁾

A chemical determination of orange juice in refreshments, concentrated and liophilized juices and jams is described.

The method involves the precipitation of the quaternary ammonium bases by Reineck salt, separation of the different bases by paper chromatography and colorimetric determination of betaine, natural compound present in the orange juice, as betaine reineckate.

Results obtained with a great variety of orange species, showed that the determination is practical, reproducible, simple and that it can be done in any modest laboratory.

The method seems to be specific for citric fruits; in mixtures orange and apple, pineapple, or tomato juices, for instance, the orange juice was easily determined.

The betaine content of different Brazilian orange was determined; the mean value found was 85 mg of betaine per 100 ml of juice.

The betaine content of 37 elaborated products was determined. From these, 23 were prepared in our laboratory.

It was found that the storage time does not alter the betaine content of the elaborated product.

The sensitivity of the method permits the determination of orange juice content of refreshments to the dilution of 1%.

Constitue um sério problema para os laboratórios incumbidos de controlar a qualidade e autenticidade de produtos alimentícios a determinação da porcentagem de suco de laranja que entra na composição de refrescos, aperitivos, concentrados, geleias, laranjadas.

Essa afirmação é tão verdadeira, que não encontramos até hoje um método que tenha sido estabelecido para esse fim, por qualquer laboratório oficial de controle de alimentos.

A determinação convencional do nitrogênio, fósforo e potássio e subsequente re-

lacionamento, além de muito trabalhoso, não conduz a nenhum resultado aceitável; além disso, a introdução de aditivos químicos nesse tipo de produtos leva a erros que não podem ser evitados.

Para uma correta avaliação desses produtos era necessário encontrar-se na laranja um componente específico, quimicamente dosável e em porcentagem razoavelmente constante.

UNDERWOOD & ROCKLAND separaram e dosaram os aminoácidos livres em uma série de sucos de frutas cítricas, e concluíram ser razoavelmente constante e

(1) Trabalho realizado na Seção de Química Biológica e Espectrografia do Instituto Adolfo Lutz. Patrocinado pelo Fundo de Pesquisas do Instituto Adolfo Lutz. Apresentado no 10.º Congresso Latino-Americano de Química em São José da Costa Rica, em fevereiro de 1969.

(2) Da Seção de Química Biológica e Espectrografia do Instituto Adolfo Lutz.

específica da variedade a presença dêsses compostos, independentemente da origem geográfica dos frutos.

LEWIS, em 1966, verificou conter a laranja, betaína em porcentagem relativamente constante e quimicamente dosável. O autor encontrou a porcentagem de 72,4 mg% de betaína como valor médio na dosagem de 6 sucos de laranja (2 da Flórida, 1 de Valência da Austrália, 2 de Israel e 1 da Espanha). Analisou também 49 amostras de sucos concentrados de laranja.

O método usado por Lewis consistiu em separar a betaína de outros componentes do suco, cromatograficamente em duas colunas sucessivas, dosando finalmente a betaína pelo método de WALKER E ERLANDSEN⁽³⁾.

A literatura registra alguns trabalhos sobre métodos químicos para separação e dosagem de betaína em produtos naturais, através da cromatografia em coluna^(4, 5, 6, 7), cromatografia em camada delgada^(8, 9) e cromatografia em papel⁽¹⁾.

O método que passamos a descrever baseia-se na precipitação da betaína contida na laranja, usando o reineckato de amônio em meio ácido como agente precipitante, purificando o reineckato de betaína por cromatografia em papel ascendente e dosagem espectrofotométrica do eluato etanólico.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

- Cloridrato de betaína
- Sal de Reineck
- Ácido clorídrico
- Éter di-etílico-água (140:1)
- Acetona aquosa 70% v/v
- Etanol
- Solvente
 - Butanol-ácido acético-água (10:5:2)
- Solução de Reineckato de amônio (preparar no momento de usar)

Dissolver 1,5 g de sal de Reineck em 100 ml de água destilada;

Agitar bem e acertar o pH ao redor de 1, com HCL N. Deixar em repouso à temperatura ambiente, por 30 minutos. Filtrar.

Método

a) Determinação da betaína em sucos de laranja

Pesar 30 g ou pipetar 30 ml de suco de laranja, transferir para copo de 150 ml e resfriar, deixando em gelo por 10 minutos.

Adicionar de 10 a 15 ml do Reineckato (usar sempre excesso) e deixar em gelo por 2 horas.

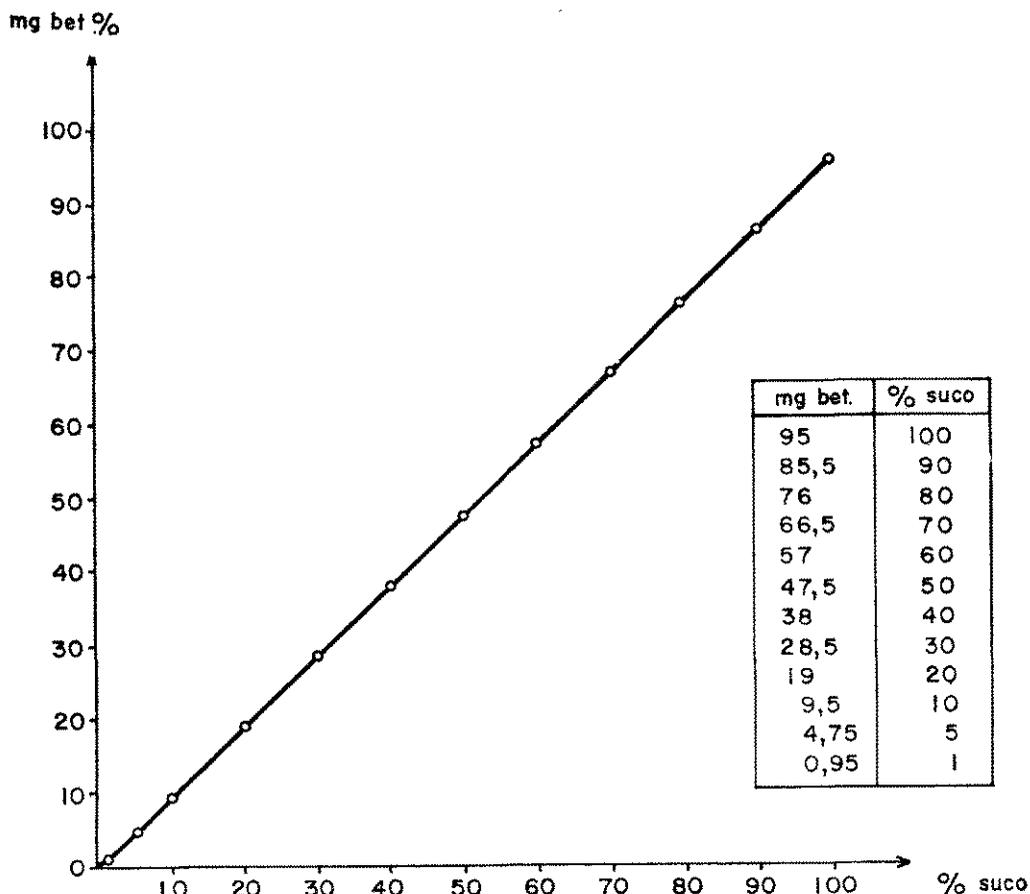
Recolher o precipitado filtrando através papel; lavar o precipitado e o copo com 3 porções de 2 ml de éter-água (140:1). Transferir o precipitado para balão volumétrico de 25 ml, com auxílio da acetona-aquosa a 70%. Completar o volume com o mesmo dissolvente e homogeneizar.

b) Cromatografia

Cromatografe em papel ascendente usando tiras de papel Whatmann nº 1, de 4 por 13 cm, transferindo para o papel quantidade tal da amostra que contenha de 5 a 100 μ g de betaína (ótimo 50 μ g).

Desenvolver o cromatograma com o butanol-ácido-acético-água (10:5:2), secar ao ar. Eluir a mancha formada a um Rf entre 0,72 e 0,77 com 10 ml de etanol, por contato durante 15 minutos. Lêr a absorção dessa solução em espectrofotômetro apropriado a 320 μ g, usando o eluente como branco. (Foi usado o Beckmann D U). Compare na curva padrão e calcule a quantidade porcentual de betaína no suco.

Para produtos industrializados, prepare diluições aquosas apropriadas do produto e proceda como para suco de laranja; das quantidades de betaína obtida calcule o teor de suco de laranja no produto, usando como base o valor médio de betaína no suco que é o de 94,5 mg/100 ml, ou use os valores do gráfico.



Relação entre mg% de betaina e porcentagem de suco de laranja no produto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método aqui apresentado é simples, reproduzível, realizável em qualquer laboratório mesmo modesto, não apresentando os inconvenientes e as dificuldades da cromatografia em coluna.

A lei de Beer é obedecida entre concentrações de 5 a 100 mg de betaina nas condições estabelecidas no método (curva padrão).

A precipitação da betaina e o cromatograma devem ser feitos no mesmo dia;

o decurso de 24 horas entre a precipitação e a cromatografia pode causar erro até de 30%, para menos, pois o Reineckato de betaina se decompõe muito facilmente.

Determinou-se inicialmente a quantidade de betaina existente nos sucos de diferentes espécies de laranjas encontradas em mercados brasileiros, cujos valores médios se encontram no quadro I. Vê-se que a laranja Pera (*Citrus aurantium L.*) apresenta o mais elevado teor de betaina (113 mg % p/v) e a Ponkan o menor teor (47,2 mg % p/v).

QUADRO I

Quantidade de betaina em sucos de laranjas brasileiras

Variedades de laranja	Betaina por 100 ml de suco mg
Pera (<i>Citrus aurantium</i> L.)	113,0
Bahia (<i>Citrus sinensis</i> L.)	100,6
Lima (<i>Citrus sinensis</i> L.)	99,0
Seleta (<i>Citrus aurantium</i> , v. <i>depressum</i>)	88,0
Tangerina (<i>Citrus nobilis</i> , v. <i>deliciosa</i>)	88,0
Lisa	80,0
Lima lisa	83,3
Mixirica (<i>Citrus nobilis</i>)	83,0
Ponkan	47,2

As variedades industrialmente mais usadas são: Bahia, Pera, Seleta, e Lisa. O valor 95,4 mg betaina/100 ml suco representa a média nessas 4 variedades.

Verificou-se a influência do estado de maturação sobre o conteúdo de betaina das laranjas; o máximo de concentração é atingido nas laranjas maduras. Laranjas verdes e laranjas em início de putrefação a apresentam baixo teor de betaina, como mostra o quadro II:

QUADRO II

Quantidade de betaina na laranja nas diversas fases de maturação

Variedades de laranja	Estado de maturação	Betaina por 100 ml de suco mg
Pera	verde	28
Lisa	verde	28
Bahia	verde	28
Pera	em putrefação	58

Carvão ativo não adsorve betaina; amstras de refrigerantes artificiais fortemente coloridos aos quais se adicionou suco de

laranja foram previamente descoloridos com carvão e o teor de betaina encontrado foi o esperado.

O tempo de armazenamento pouca influência exerce sobre a estabilidade da betaina; refrescos contendo 70% de suco de laranja, 8% de açúcar e 0,15% de benzoato de sódio foram controlados durante 70 dias; não houve praticamente queda no teor da betaina.

A sensibilidade do método para refrescos e produtos similares permite a dosagem do suco de laranja até diluição de 1%.

Pesquisou-se a presença de betaina em outras frutas cujos sucos comumente podem ser misturados ao de laranja; abacaxi (*Bromelia ananas* L.), maçã (*Pyrus malus* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) não contém betaina.

Diversas variedades de limão e "grape fruit" contêm betaina e os teores médios estão no quadro III.

QUADRO III

Quantidade de betaina em limões e "grape Fruit"

VARIEDADE	Betaina por 100 ml de suco mg
Limão siciliano (<i>Citrus limonia</i> O.)	36,0
Limão cravo	29,0
Limão Haiti	63,6
Grape fruit	39,3

Em refrescos contendo além de suco de laranja, suco de abacaxi, de maçã, ou de tomate ou ainda mistura dos quatro, a quantidade de suco de laranja foi dosado sem dificuldade, e os teores de betaina obtidos corresponderam sempre ao esperado.

Dosou-se o teor de betaina também em aperitivos, geléias, concentrados, liofilizados e laranjadas comumente encontradas no nosso comércio.

Testes de recuperação de betaina foram feitos usando-se como suporte um refrigerante artificial de laranja isento de betaina,

ao qual se adicionou 10 mg de betaína por 100 ml do produto. A média de 5 determinações foi de 98,5%, sendo o resultado maior 101% e o menor 97,8%.

RESUMO

Descreve-se um método químico para a determinação da porcentagem de suco de laranja em refrescos, concentrados, suco liofilizado, geléias e aperitivos.

O método baseia-se na precipitação das bases quaternárias de amônio, pelo sal de Reineck, separação das diferentes bases por cromatografia em papel e determinação colorimétrica da betaína, componente natural e constante da laranja, na forma de reineckato de betaína.

Os resultados obtidos com uma série grande de sucos de laranja de diferentes espécies levam à conclusão de que o método é praticável, reproduzível, simples e de baixo custo, realizável em qualquer laboratório modesto.

O método mostrou-se específico para frutas cítricas; em misturas de suco de laranja com os de maçã, abacaxi, tomate, por exemplo, o suco de laranja foi determinado facilmente.

Foi determinado o conteúdo de betaína em diferentes espécies de laranjas brasileiras, sendo encontrado o teor médio de 95 mg de betaína por 100 ml de suco.

Determinou-se o teor de betaína em 37 produtos elaborados; desses, 23 foram preparados em nosso laboratório.

Verificou-se que o tempo de armazenamento não altera o conteúdo de betaína dos produtos elaborados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CARRUTHERS, A.; OLDFIELD, J. F. T. & TEACGE, H. J. — The removal of interfering ions in the determination of betaine in sugar beet juices and plant material. *Analyst* 85:272-5, 1960.
2. DONALD, D. C.; WALL, J. S.
3. ENEROTH, P. & LINDSTEDT, G. — Thin-layer chromatography of betaines and other compounds related to carnitine. *Anal. Biochem.* 10:479, 1965.
4. GRYLLUS, E. & MAGYAR, K. — Application of ion exchanges in the Hungarian food industries. *Elelm. Spas* 20:102, 1966. Resumo *in Chem. Absts.*
5. LEWIS, W. M. — Chemical evaluation of orange juice in compounded soft drinks. *J. Sci. Fd. Agric.* 17:316, 1966.
6. SCHULZE, A. — Recovery of betaine or its salts from molasses residue with ion exchange resins.
7. SULLIVAN, G. & BRADY, L. R. — Thin-layer chromatographic separation of betaine, choline and muscarine. *Lloydia* 28(1):68-70, 1965. Resumo *in Chem. Absts.* 63:8180g, 1965.
8. UNDERWOOD, J. C. & ROCKLAND, L. B. — Nitrogenous constituents in citrus fruits. 1: Some free amino acids citrus juices determined by small-scale filter paper chromatography — *Fd. Res.* 18(1):17-29, 1953.
9. WALKER, H. G. & ERLANDSEN, R. — Rapid method for determination of betaine. *Anal. Chem.* 23(2):1309, 1951.

Recebido para publicação em 5 de agosto de 1969.

ADULTERANTES NA PANIFICAÇÃO. IDENTIFICAÇÃO DO BROMATO DE POTÁSSIO (1)

ADULTERANT IN BREAD. IDENTIFICATION OF POTASSIUM BROMATE

WALDOMIRO PREGNOLATTO (2)

CECY M. T. CHAHIN (2)

MYRNA SABINO (2)

SUMMARY

The use of oxidant agents (bromate, iodate, peroxide and persulfate) in bread-making is forbidden by the Brazilian food law.

However, it has been suspected that potassium bromate have been used by some bakers.

A paper chromatography method was developed to detect bromate in flour, bread, baking products, yeast and baking powder. It has been established the Rf values of bromate, iodate chlorate, persulfate, dichromate and permanganate.

During 4 months, 1,672 samples of flour, bread, yeast and baking powder were analysed with a positive test in 325 samples.

INTRODUÇÃO

Branqueadores artificiais são ocasionalmente usados em farinhas de qualidade inferior com a finalidade de melhorar a aparência dos produtos resultantes de sua industrialização, principalmente dos pães. Essa prática, quase sempre perigosa, pois geralmente é efetuada por pessoas não credenciadas, ignorantes mesmo, é considerada uma adulteração e proibida pelas leis brasileiras.

O bromato de potássio é uma dessas substâncias. Sobre a toxicidade dos bromatos para o homem, pouco se sabe, sendo eles porém considerados um pouco menos tóxicos do que os iodatos. Essa já é, por si, uma importante razão para se proibir o uso desses compostos na panificação.

Quando é usado em quantidade mínimas, como por exemplo, 70 p.p.m. em farinhas, o bromato é destruído na panificação, sendo então praticamente impossível detectá-lo no pão.

Industriais e comerciantes inescrupulosos introduziram clandestinamente o uso do bromato de potássio em São Paulo, como melhorador e branqueador no processo de panificação, oferecendo o produto às panificadoras em forma de solução aquosa, misturado às diástases, em proporções superiores a 50% e, ainda, na forma de sal puro.

Possuindo o bromato de potássio a propriedade de branquear a massa, produzir pães menos densos e mais agradáveis à vista, foi êle imediatamente aceito, passando a ser usado nas mais absurdas proporções e sem qualquer contrôle. Como resultante, em uma intoxicação alimentar coletiva, principalmente de crianças, foram observados alguns casos com sintomatologia pouco evidente, não ficando positivado, de imediato, a causa da intoxicação. Porém, tudo ficou esclarecido, quando pães e bolos causadores de intoxicação coletiva em uma reunião festiva infantil foram examinados e neles não foi encontrada outra substância

(1) Trabalho realizado na Secção de Química Biológica e Espectrografia do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz

que bromato de potássio em quantidade alarmante.

Essa foi a primeira confirmação da suspeita que tínhamos de que o bromato de potássio estava sendo usado indiscriminadamente em padarias de São Paulo. Iniciamos, então, em larga escala, uma pesquisa de bromatos em pães, farinhas e fermentos. Confirmada a suspeita, solicitamos das autoridades fiscalizadoras a apreensão e envio das amostras daqueles produtos usualmente vendidos em todo o território do Estado de São Paulo.

Para levar a efeito uma pesquisa em tão larga escala, necessário se tornou estabelecer técnicas e métodos de trabalho que fossem simples, de rápida execução e de resultados aceitáveis.

Provas qualitativas para indicar presença de agentes oxidantes, como o bromato de potássio, estão descritas na literatura. Nos métodos de análises do "Official Methods of Analysis" vem descrita uma técnica para positivar a presença de bromatos ou iodatos em farinhas, técnica essa baseada na oxidação do íon I^- a iodo em presença de ácido, pelo bromato ou iodato. Para o mesmo fim, ECKHAUT⁵ usa a sulfofucsina, com a vantagem de que com este reagente se podem distinguir os bromatos dos peróxidos, nitritos, persulfatos e perboratos. DANGOUMAN & DUCOS⁴ pretendem dosar bromato de potássio em pães, destruindo o material orgânico com a mistura nitropermangânica em presença de nitrato de prata, reduzindo depois o sal formado a brometo de prata com zinco e ácido sulfúrico, oxidando o íon Br^- a bromo, com dicromato de potássio e por fim fazendo este reagir com fucsina, medindo então espectrofotometricamente a rosanilina formada, a 570 m μ ; HASHIMI & AYAZ⁶ *et alii* usam ácido o-aminobenzóico em solução ácida para determinar bromato, pois este reage com o íon BrO_3^- , dando uma solução colorida vermelho acastanhada que obedece à lei de Beer; identificam êles, assim, virtualmente até 5 μ g/ml de solução; clorato e iodato, por exemplo, não interferem.

ARMANDOLA² recomenda, para identificação de bromatos, o uso de uma mistura de solução alcoólica de o-toluidina a 0,1% e HCl concentrado (1:1); obtém-se, assim, um produto colorido de vermelho com um halo amarelo.

De todos esses métodos, o mais simples e sensível continua sendo a reação entre o agente oxidante e o íon I^- em meio ácido em presença de amido.

CHIE-HSIANG MAO³ separam por cromatografia em papel circular os íons BrO_3^- , ClO_3^- , e IO_3^- , usando como dissolvente a mistura butanol-acetona-amônia (1:3:1). Como só conseguimos consultar um resumo desse trabalho no "Chemical Abstracts", onde não aparecem os Rf nem detalhes de técnica, reestudamos o problema detalhadamente e aplicamos assim a técnica resultante em nossos trabalhos de rotina.

MATERIAL E MÉTODOS

O método por nós estabelecido envolve:

1. Preparo da amostra
2. Positivção do agente oxidante
3. Identificação cromatográfica

MATERIAL

Reagentes

- a) Solução de iodeto de potássio a 1% p/v (1 g de iodeto de potássio dissolvida em 100 ml de água desmineralizada). Guarde na geladeira e use no máximo durante 8 dias.
- b) ácido clorídrico (1:4) v/v
- c) solução de iodeto de trabalho — Mistura de partes iguais das soluções dos itens a e b, preparada no momento de usar.
- d) Solvente — n-butanol-acetona-amônia (1:3:1)
- e) Solução de amido aquoso 1% p/v

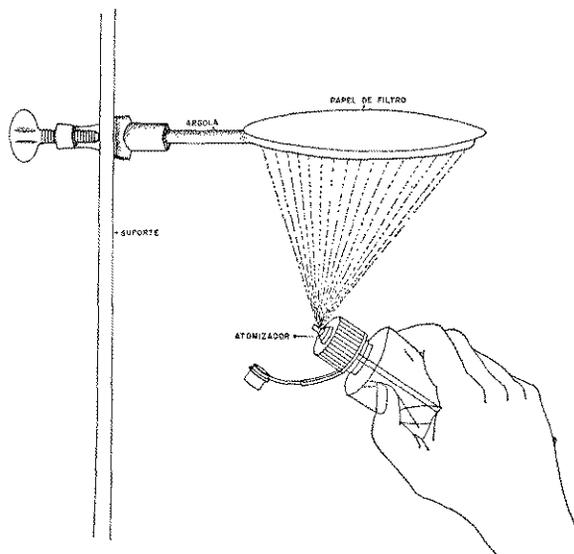
p/v — Pêso em volume
v/v — volume em volume

MÉTODO

Preparo da amostra

a) *Para farinhas* — Com o auxílio de

uma peneira malha 40, distribua 5 g da farinha sobre uma folha de papel de filtro circular de 11cm de diâmetro, colocado sobre um suporte circular de plástico ou vidro (veja fig.).



b) *Para pães, biscoitos e similares* — Seque 50 g do material em estufa a 105°C por 30 min., deixe esfriar e triture até pó fino. Com auxílio de peneira malha 40 distribua 5 g do pó sobre uma folha de papel de filtro circular de 11 cm de diâmetro, como para farinhas.

Positivação do agente oxidante

Com o auxílio de um atomizador (do tipo usado para pulverizar laquê, pulverize a solução do iodeto de trabalho (item c) em baixo do papel de filtro que contém a amostra, de baixo para cima (veja fig.), até o líquido atingir o pó.

O aparecimento de pontos violeta indica presença de agentes oxidantes. Farinhas, contendo 70 p.p.m. de bromato de potássio, apresentaram, nessas condições, pontos violeta no papel.

As amostras que se apresentaram com reação positiva foram separadas para se identificar cromatograficamente o oxidante.

Cromatografia

Transfira 10 g da amostra finamente pulverizada para frasco de 100 ml, junte 20 ml de eter de petróleo, agite bem e deixe que as camadas se separem; junte então 5 ml de hidróxido de sódio a 2% p/v, aqueça em banho-maria a 60°C por cerca de 5 min., esfrie e filtre. Transfira 50 µl da última porção do filtrado para tiras de papel Whatmann n. 1, de 5x15 cm. Desenvolva o cromatograma com n-butanol-acetona-amônia (1:3:1). Seque ao ar. Revele com a solução de iodeto de potássio de trabalho. Na presença de bromato, aparece mancha amarelo-parda a um Rf de 0,64 a 0,54 (padrão 0,63), que fica violeta pela adição de 1 gota de amido.

Os íons ClO_3^- , IO_3^- , CrO_4^{2-} , possuem respectivamente os Rf de 0,75, 0,20 e 0,11.

O íon $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ possui um Rf de 0,60, muito próximo portanto do bromato, mas que se distingue deste último pela demora no aparecimento da mancha. A mancha correspondente ao ClO_3^- também só aparece depois de cerca de 30 minutos. Aquecimento

do papel em estufa a 50°C durante 20 min. acelera o aparecimento da mancha. O ion MnO_4^- permanece na base.

Com a técnica descrita, visualiza-se até 0,1 μ g de bromato, clorato ou iodato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Usando as técnicas descritas, foram analisadas, entre os meses de dezembro de

1968 a maio de 1969, 1 018 amostras de pão, 329 amostras de farinhas e 325 amostras de fermentos. Estas amostras foram colhidas na Capital e em mais 102 cidades do interior do Estado.

O trabalho está sintetizado no seguinte quadro:

Tipo de produto, origem, número, e percentagem de positividade das amostras analisadas

Produtos	Procedência		Total n.º	Positividade		Total %
	Capital n.º	Interior n.º		Capital %	Interior %	
Pão	566	452	1 018	33,80	31,20	65,00
Fermentos	43	282	325	12,90	5,03	17,93
Farinhas	34	295	329	14,70	2,37	17,07
TOTAIS	643	1 029	1 672	61,40	38,60	100,00

Os 103 municípios pesquisados representam cerca de 20% dos municípios do Estado de São Paulo; desses, só em 3 não ficou positivado o emprêgo do bromato na panificação, o que significa uma percentagem de 97,08% de positividade nos municípios pesquisados. É lícito, portanto, deduzir que praticamente o bromato estava sendo usado em quase todos os municípios do Estado.

A magnitude do problema aumenta ainda se se levar em consideração que, em pães fabricados com farinhas contendo 70 p.p.m. de bromato, não se consegue provar a presença de bromato: isto quer dizer que um grande número de amostras dadas como negativas provavelmente foram fabricadas com adição de bromato às farinhas, ou com farinhas já contendo o bromato.

Esse tipo de fraude ficou, portanto, esclarecido.

Um outro tipo de fraude também muito importante, que comprovamos, é o resultado da adição de bromato de potássio a fermentos biológicos usados na panificação,

como as diástases. Um grande número de produtos rotulados como Diástase, consistia na verdade, em misturas contendo, na maioria dos casos, 50% de bromato de potássio. Esta já não é uma fraude por ignorância, mas consciente, praticada por pessoal especializado e inescrupuloso.

Os nossos trabalhos continuam; outros produtos estão agora sendo analisados pela técnica aqui empregada, numa tentativa de banir completamente este tipo de fraude.

RESUMO

O uso de agentes oxidantes, tais como os bromatos, peróxidos, persulfatos em farinhas e em produtos de panificação é considerado uma fraude pelas leis brasileiras.

Todavia, um grupo de industriais inescrupulosos introduziu clandestinamente o bromato de potássio como agente melhorador e branqueador, na panificação.

Método analítico foi estabelecido para indicar a presença desses agentes oxidantes

em farinhas, pães e similares, e em fermentos químicos e biológicos. As amostras com reação positiva foram cromatografadas para se identificar o oxidante.

Foi estabelecido um Rf dos seguintes compostos: bromato, iodato, clorato, cromato, persulfato e permanganato de potássio.

Foram analisados em 4 meses 1 672 amostras de produtos provindos de 102 municípios do interior e mais a Capital, sendo que 1 018 eram de pães, 329, de farinhas e 325, de fermentos diversos. A presença de bromato de potássio foi positivada em 367 amostras.

O uso de bromato em produtos de panificação ficou positivado em 100 dos 103 municípios pesquisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION Official Agricultural Chemists — Official Methods of Analysis, 10 ed. Washington, A. O. A. C., 1965. p. 200.
2. ARMANDOLA, P. — Detection of some artificial bleaching substances added to wheat flour. Selez. Tec. Molit. 14(24):111-2; 114, 1963. Resumo in Chem. Abstr. 61(1):1173h.
3. CHIE-HSIANG MAO — Studies on circular paper chromatography. II. The separation of chlorate, bromate, and iodate ions. Hua Hsueh Hsueh Pao 30(4):412-4, 1964. Resumo in Chem. Abstr. 61(13):15324c.
4. DANGOUMAN, A. & DUCOS, R. — Determination of potassium bromate in bread. Chim. Analyt. 44:292-4, 1962. Resumo in Chem. Abstr. 57:11609c.
5. EECKHAUT, R. G. — Use of bromates and new method of determining them in flour. Bull. Ec. Meun., Belge 20:54-9, 1958. Resumo in Chem. Abstr. 53:4596i.
6. HASHMI, M. H. & A. A. — Simultaneous determination of hypobromite, bromite, and bromate using ammonium sulfate. Anal. Chem. 35(7):908-9, 1963. Resumo in Chem. Abstr. 59(4):3305g.

Recebido para publicação em 4 de novembro de 1969

PURIFICAÇÃO DE *TOXOPLASMA GONDII* DE EXSUDATO PERITONEAL DE CAMUNDONGO, EM COLUNA DE ALGODÃO DE NYLON⁽¹⁾

USE OF NYLON-COTTON COLUMNS FOR THE PURIFICATION OF *TOXOPLASMA GONDII*

AUGUSTA KIYOMI TAKEDA ⁽²⁾
MATHILDE RASKIN ⁽²⁾
RENATE DANEMANN ⁽³⁾

SUMMARY

A simple procedure for purification of toxoplasma from mouse peritoneal exudate in columns of nylon-cotton is described, showing reproductibility and satisfactory recovering of the parasites.

INTRODUÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi a obtenção de toxoplasmas puros, sem a presença de outras células habitualmente encontradas no exsudato peritoneal de camundongos inoculados com estes parasitos.

Os métodos descritos para a mesma finalidade, tais como os de FULTON & TURK^{1, 3}, TSUNEMATSU² e YANOWSKY⁴, são trabalhosos e apresentam rendimento relativamente baixo.

A técnica ora descrita, em que é empregado o algodão de nylon, é de fácil manipulação, apresenta rendimento alto e reduz os riscos de contaminação do pessoal técnico.

MATERIAL E MÉTODOS

Os exsudatos peritoneais foram obtidos de camundongos inoculados com toxoplasmas, de acôrdo com Yanovisky.

Foram utilizadas colunas de algodão de

nylon⁽⁴⁾, lavado durante 10 dias, com trocas diárias de água destilada; essas colunas foram montadas em buretas de 1 cm (diâmetro externo), colocando-se 2 g de algodão de maneira a atingir a altura aproximada de 25 cm. As colunas foram previamente equilibradas com o líquido de eluição.

Como líquido de eluição foi utilizada solução tampão fosfatada 0,15 M — NaCl 0,15 M — pH 7,2.

Na presente técnica, contrariamente ao preconizado por RABINOWITZ⁵ e GARVIN⁶ para purificação de leucócitos, não foi utilizada a incubação prévia das colunas, a 37°C, 30 minutos, em virtude de observações preliminares terem demonstrado que tal procedimento teve efeito contrário, prejudicando a purificação das amostras.

Os exsudatos, imediatamente após a colheita, foram submetidos a contagens de toxoplasmas e células/ml, em câmara de Neubauer. Em seguida foram centrifuga-

- (1) Trabalho realizado na Seção de Imunologia da Diretoria de Microbiologia e Diagnóstico do Instituto Adolfo Lutz.
- (2) Do Instituto Adolfo Lutz
- (3) Estagiária da Seção de Imunologia da Diretoria de Microbiologia e Diagnóstico do Instituto Adolfo Lutz.
- (4) LP-1 Leuko Pak R. Leucocyte filter, Fenwal Laboratories, Div. Travenol Labor. Inc. Morton Grove, Illinois 60053.

dos a 4430 G durante 15 minutos e, de acôrdo com a contagem inicial, os sedimentos foram ressuspensos em volumes variáveis dos respectivos sobrenadantes, de maneira a obter-se aproximadamente 100×10^6 toxoplasmas/ml.

Os exsudatos assim corrigidos foram adicionados, pouco a pouco, ao tópo da coluna e, após penetração total, foi iniciada a eluição, coletando-se volumes de 1 ml, com velocidade de 15 gotas por minuto. De cada tubo de eluição foram feitas contagens de toxoplasmas e células/ml.

Repasagens dos eluatos em colunas de 0,7 cm x 4 cm (diâmetro externo) foram feitas para completar a purificação das amostras.

O algodão de nylon pode ser reaproveitado, lavando-se a coluna com EDTA a 2% e, depois, várias vezes com água destilada; a seguir, seca-se o algodão em estufa a 37°C.

RESULTADOS

O valor médio das contagens iniciais de sete amostras diferentes de exsudatos peritoneais de camundongos inoculados com toxoplasmas foi 97×10^6 toxoplasmas/ml e 71×10^6 células/ml.

De acôrdo com os resultados obtidos, aproximadamente 92% das células presentes no exsudato peritoneal foram retidas. Cêrca de 8% (hemácias e células mononucleares pequenas), foram eluídas juntamente com os toxoplasmas, mas não distribuídas homogêneamente, sendo que em alguns eluatos, como por exemplo no tubo 4, praticamente a quantidade de células foi desprezível em relação ao grande número de toxoplasmas, como mostram as fotografias do esfregaço inicial (Fig. 1) e do tubo 4 (Fig. 2).

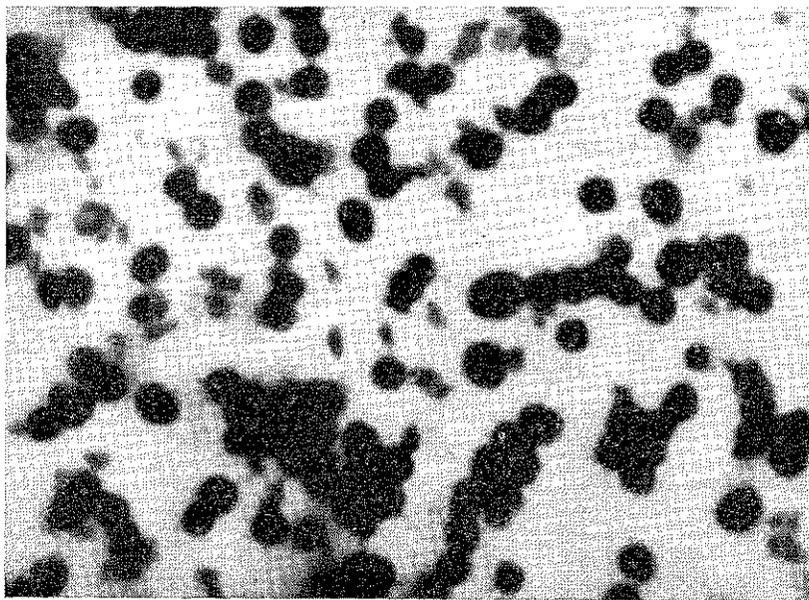


Fig. 1 — Exsudato peritoneal de camundongo infectado com *Toxoplasma gondii*, antes de passar na coluna.

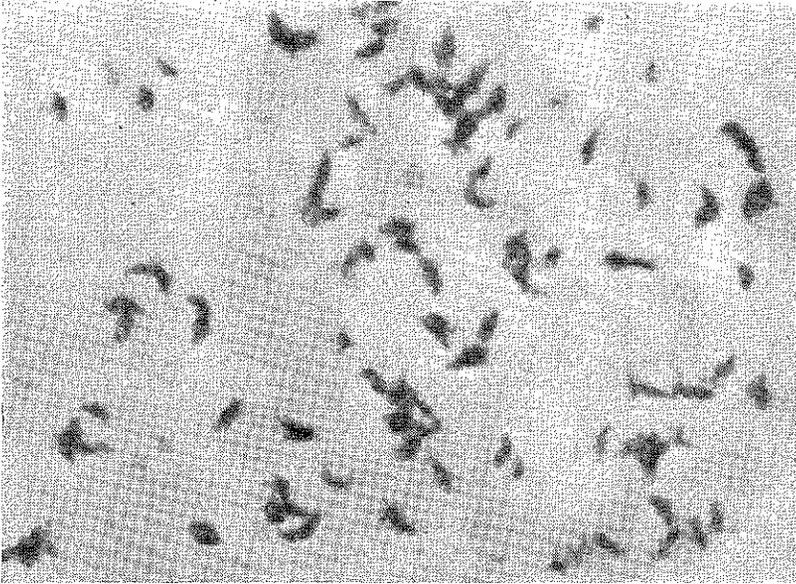


Fig. 2 — Toxoplasmas praticamente puros, após passagem em coluna de algodão de nylon (tubo n.º 4).

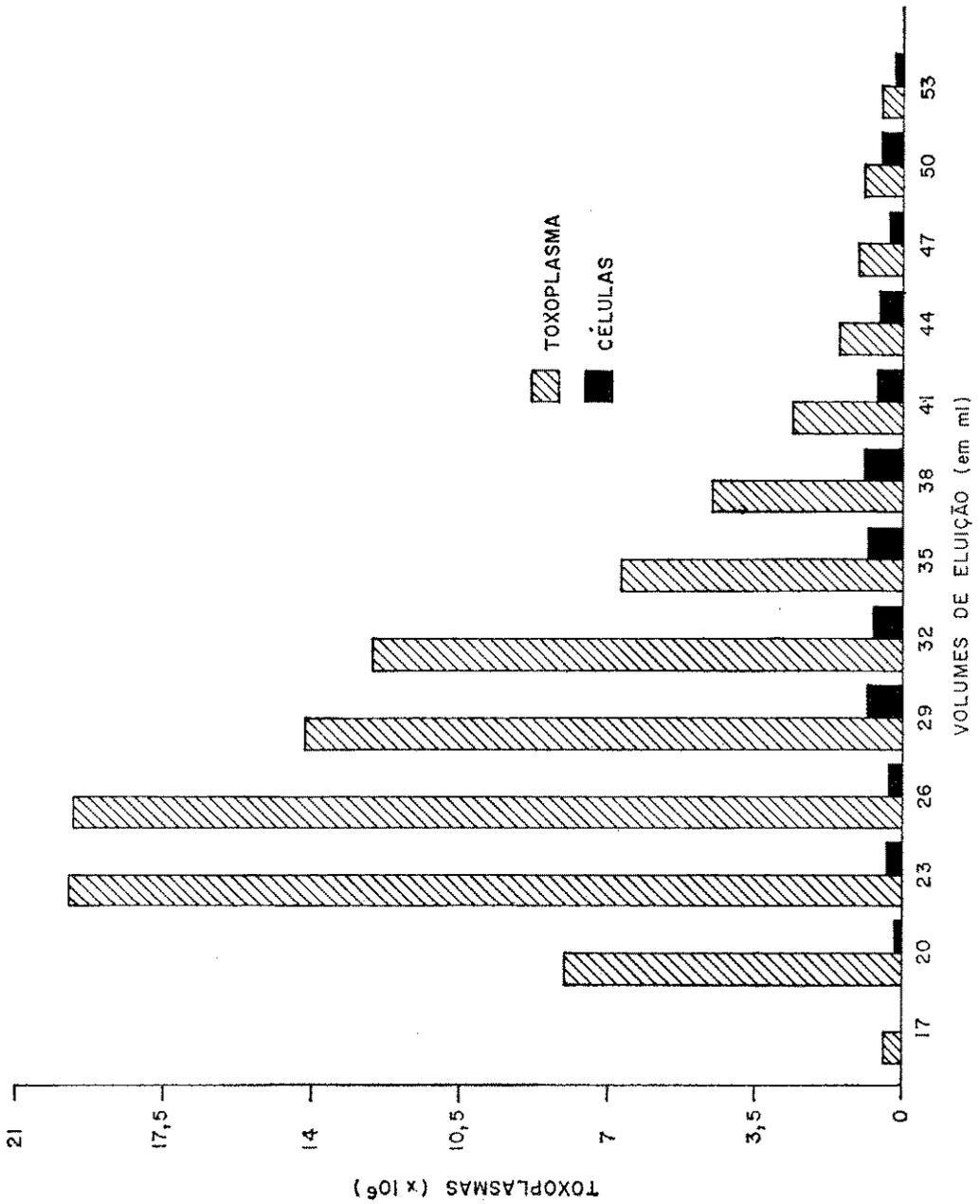
Os eluatos com toxoplasmas, em três amostras que foram repassadas em coluna de algodão de nylon, na ausência de proteína e de sais de cálcio e magnésio, foram

eluídos praticamente puros, havendo, porém, redução do número de parasitos.

Os valores médios de sete experimentos são apresentados no quadro seguinte e as médias de suas distribuições, no gráfico.

Valores médios e relação do Toxoplasma-célula

N.º dos Tubos	Valores Médios		Relação	
	Toxoplasma $\times 10^6$	Células $\times 10^6$	Células eluídas %	Toxoplasma-células %
1	424	0	0,00	100,00
2	7 973	150	0,21	98,15
3	19 778	361	0,51	98,20
4	19 683	316	0,45	98,41
5	14.155	850	1,20	90,40
6	12 582	646	0,90	79,64
7	6 694	796	1,14	90,82
8	4 507	919	1,30	83,10
9	2 581	599	0,84	81,20
10	1 450	522	0,74	73,53
11	1 006	285	0,40	77,90
12	861	446	0,63	65,90
13	463	122	0,17	79,10



RESUMO

É descrito um método simples de purificação de toxoplasma do exsudato peritoneal de camundongos, em coluna de algodão de nylon, mostrando a reprodutibilidade e satisfatória recuperação dos parasitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FULTON, J. D. & TURK, J. L. — Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. Lancet 2:1068-9, 1959. Preliminary Communications.
2. TSUNEMATSU, Y. — Purification of *Toxoplasma* by means of sonic vibration and tryptic digestion. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 9(6):556-61, 1960.
3. FULTON, J. D. & SPOONER, D. F. — Preliminary observations on the metabolism of *Toxoplasma gondii*. Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg. 51(2):123-4, 1957. Communications.
4. YANOVSKY, J. F. TRAVERSA, O. C.; SCHMUNIS, G. A.; CANTARELLA, A.; PANDIELLA, A. A. & POTHIER, M. S. — Nouvel antigène pour la réaction de fixation du complément pour le diagnostic de la Toxoplasmose. Ann. Parasit. Hum. Comp. 43(5):539-44, 1968.
5. RABINOWITZ, Y. — Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leukocytes and monocytes on glass columns including tissue culture observations. Blood 23(6):811-28, 1964.
6. GARVIN J. E. — Factors affecting the adhesiveness of human leucocytes and platelets in vitro. J. Exp. Med. 114(1):51-73, 1961.

Recebido para publicação em 10 de dezembro de 1969

MODIFICAÇÃO DO MEIO DE BARACCHINI PARA O CULTIVO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* (1)

MODIFICATION OF BARACCHINI'S MEDIUM FOR THE CULTURE OF *TRYPANOSOMA CRUZI*

OCTAVIO BARACCHINI (2)

SUMMARY

A new liquided and heated medium for *Trypanosoma cruzi*, without red cells and protein precipitates, that gives 74×10^6 of *T. cruzi*/ml is described.

The referred medium is also indicated for cultivation of *Leishmania*.

Em trabalho anterior (BARACCHINI²) descrevemos um meio de cultura líquido, esterilizável pelo calor, para o cultivo de *Trypanosoma cruzi*. Diante das discrepâncias de resultados obtidos em alguns laboratórios que utilizam o referido meio de cultura, o autor passou a estudar as várias preparações e concluiu por uma nova fórmula que apresenta 100% de reprodutibilidade.

O meio que descrevemos, como o anterior, é de composição química indefinida, porém, é isento de precipitados de proteínas, o seu preparo é simples e fornece um rendimento de *T. cruzi* da ordem de 74×10^6 após 15 dias.

MATERIAL E MÉTODO

Preparação do meio básico

Colocar 500 ml de água destilada no copo de um liquidificador. Acionar o aparelho e, aos poucos, adicionar 100 g de coágulos de sangue humano. Deixar funcionar o aparelho durante 2 minutos. A seguir, adicionar o conteúdo de um ovo de galinha à mistura do sangue e ligar o aparelho por mais 2 minutos. Passar o líquido para um balão de vidro de 2 litros e

adicionar ao mesmo 500 ml de água destilada com 50 ml de sêro humano (o coágulo e sêro humano podem ser obtidos nos laboratórios de sorologia, onde êsse material é desprezado).

Aquecer o balão na autoclave a 115°C durante 15 minutos ou em vapor fluente durante 45 minutos.

Filtrar e refiltrar as primeiras porções no mesmo papel de filtro, até a obtenção de um líquido pardo-avermelhado, transparente e sem depósito.

Meio de cultura

Meio de cultura básico: 1 000 ml; infusão de cérebro e coração (Oxoid ou Difco): 37 g; extrato de levedura (Oxoid ou Difco): 5 g.

Deixar em repouso durante 10 minutos. Agitar para dissolver. Distribuir em balões ou vidros em quantidades não superiores à metade da capacidade dos recipientes. Tamponar com algodão e autoclavar a 115°C durante 15 minutos. O pH deverá ser de 7.2 a 7.6 (usando-se produtos Oxoid ou Difco, não será necessário acertar o pH).

(1) Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Regional de Ribeirão Preto).

(2) Do Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto.

Técnica de cultivo

Repicar o conteúdo de um tubo de um meio difásico qualquer para cada 100 ml do meio descrito. Incubar em estufa a 28°C; já após 48 horas observa-se o desenvolvimento da cultura. A passagem de meio líquido para meio líquido pode ser realizada com êxito já a partir do 7º dia, na proporção de 10%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

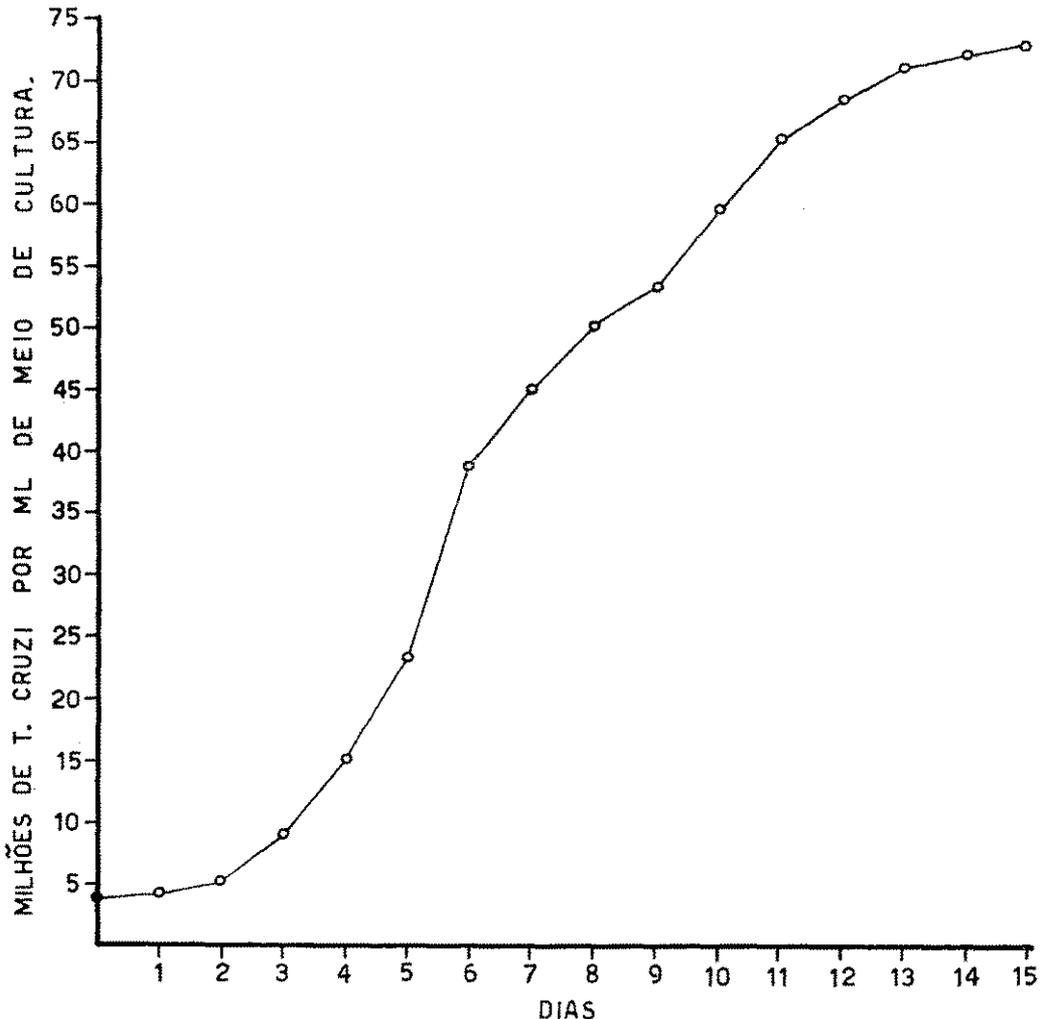
O novo meio que apresentamos, de fácil reprodução, fornece um rendimento de *T. cruzi* da ordem de 74×10^6 após 15 dias.

A incorporação de sêro à nova fórmula, provavelmente, como acentuam BONÉ & PARENT⁴, aumenta o suprimento de fatores nutricionais, no caso um fator essencial, o ácido esteárico.

O nosso objetivo foi apresentar uma fórmula simples, relativamente de baixo custo e que permita a obtenção de boas quantidades de *T. cruzi*, hoje tão necessárias para o preparo de antígenos para as reações de fixação de complemento e de imunofluorescência no diagnóstico sorológico do mal de Chagas.

No quadro abaixo apresentamos a curva de crescimento da amostra B.T. de *T. cruzi* no meio que descrevemos.

Curva de crescimento do *Trypanosoma cruzi*, amostra B. T.



Acentuamos ainda que o referido meio pode ser utilizado com sucesso no isolamento de *T. cruzi* de animais infectados (ALBUQUERQUE¹).

BRANDÃO³ obteve ótimos resultados usando o meio em epígrafe no cultivo de Leishmania para a preparação de antígenos de Montenegro.

RESUMO

Uma nova fórmula do meio de Baracchini para *Trypanosoma cruzi* é descrita, apresentando 100% de reprodutividade e com um rendimento de *T. cruzi* igual a 74×10^6 em 15 dias.

O referido meio pode ser empregado para obtenção de grandes quantidades de

T. cruzi para o emprêgo no preparo de antígenos para as reações de fixação de complemento e imunofluorescência no diagnóstico do mal de Chagas. Pode também ser empregado com sucesso no isolamento de *T. cruzi* de animais e do homem e também no cultivo de Leishmania.

BIBLIOGRAFIA

1. ALBUQUERQUE, R. D. R. — Informação Pessoal.
2. BARACCHINI, O. — Meio de cultura líquido esterilizável pelo calor para *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 22/23:91-92, 1962/63.
3. BRANDÃO, M. F. — Informação Pessoal.
4. BONÉ, G. J. & PARENT, G. — Stearic acid an essential growth factor for *Trypanosoma cruzi*. J. Gen. Microbiol. 31:261-6, 1966.

Recebido para publicação em 9 de março de 1970.

MÉTODO PARA CULTURA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM LARGA ESCALA POR AREJAMENTO (BORBULHAMENTO DE AR) ⁽¹⁾

CULTURE OF TRYPANOSOMA CRUZI IN GREAT VOLUMS BY AIR BUBLING

ETTORE RUGAI ⁽²⁾
ALTEMISIA MOREIRA DE SOUZA ⁽²⁾

SUMMARY

A technic for culture of *Trypanosoma cruzi* in great volums of liquid media by air bubling was described.

Each operation of 7.l of liquid media produced a mean of 1.2 g of dry *Trypanosoma cruzi*.

The technic can be adapted for greater volums of culture media.

INTRODUÇÃO

Para a obtenção de culturas ricas em *Trypanosoma cruzi* nos meios líquidos, é necessário trabalhar com meio em pouca profundidade, e agitação freqüente durante a incubação. Por êstes motivos, fica sempre limitado o volume do meio empregado em cada frasco, dificultando obviamente a obtenção de grandes quantidades de tripansomos

A técnica apresentada, com borbulhamento contínuo de ar durante a incubação, torna possível o emprêgo de grandes volumes do meio de cultura.

As provas, em escala piloto, foram feitas com volumes de 7 litros de meio de cultura. O meio empregado foi o de RUGAI & RUGAI ⁽³⁾.

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL

- a) Meio de cultura líquido (RUGAI & RUGAI) . . . 7 000 ml
Álcool octadecílico ⁽⁴⁾ . . . 2 g
Água destilada ⁽⁵⁾ 500 ml
- b) Frasco com capacidade de 10 litros, montado conforme o desenho da página seguinte.
- c) Motor de aquário.

MÉTODO

- a) *Montagem do aparelho, com o meio de cultura*
 - 1. Colocar no frasco de 10 l o meio de cultura, o álcool e a água destilada.
 - 2. Colocar a rôlha de borracha com as tubuladuras, sem o motor, e

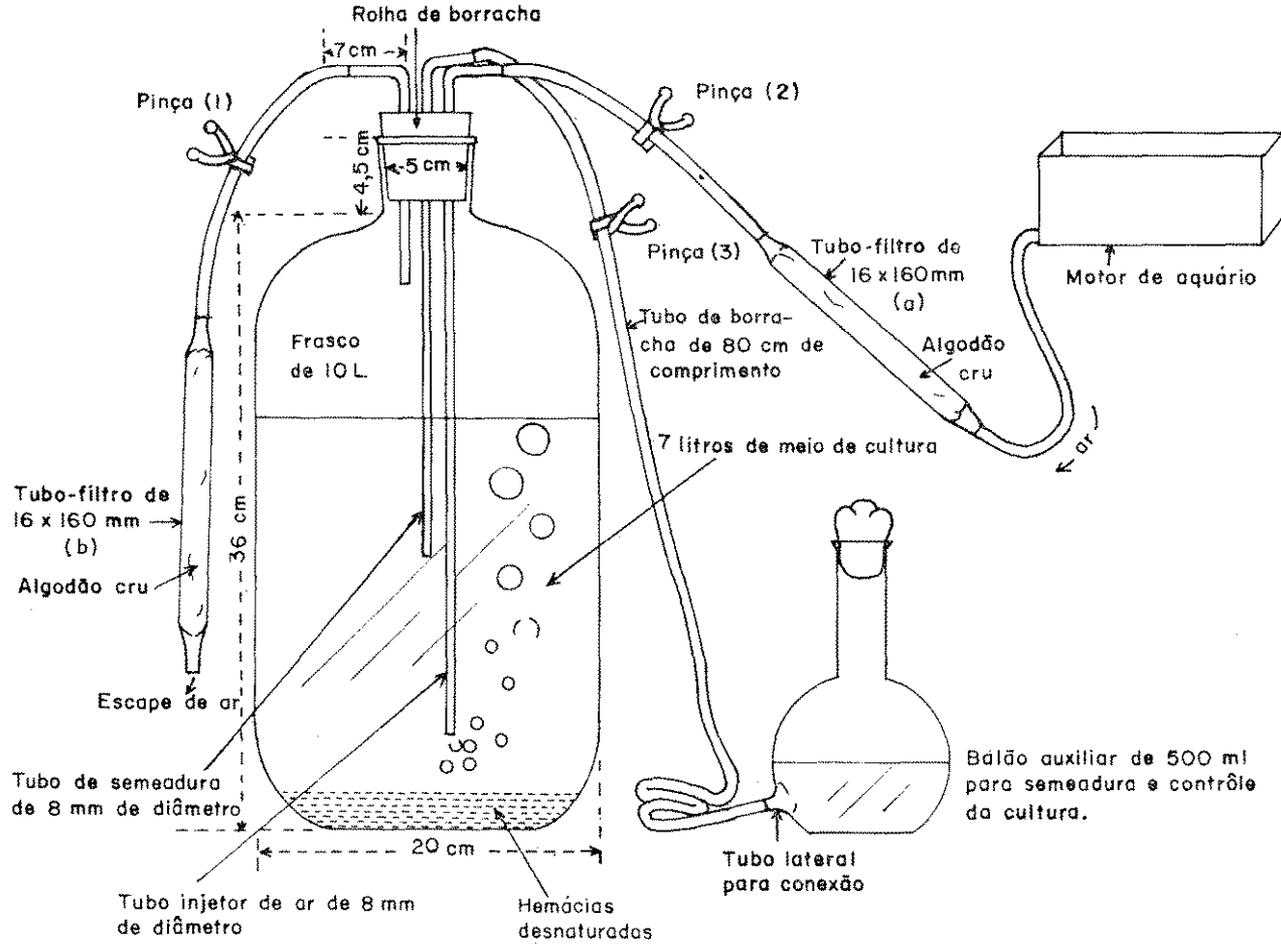
(1) Trabalho realizado na Seção de Reagentes Biológicos do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

(3) RUGAI, E. & RUGAI, R.T. — Meio de cultura para *Trypanosoma cruzi* esterilizável pelo calor. Rev. Inst. Adolfo Lutz 25/27: 61-63, 1965/67.

(4) Anti-espuma

(5) Para compensar a água evaporada durante a esterilização.



amarrar a rôlha no gargalo do frasco, firmemente, com barbante grosso.

3. Fechar o tubo-filtro injetor de ar (pinça 2 da figura) e o tubo ligado ao balão auxiliar (pinça 3). Deixar aberto o tubo filtro de escape de ar (pinça 1).
4. Esterilizar o conjunto a 115°C, durante 40 min. (deixar em vapor fluente, 10 min. antes de fechar a válvula). Repetir a esterilização após 24 horas.
5. Depois de resfriado o conjunto, levantar o tubo-filtro *a* acima do nível do gargalo do frasco e abrir a pinça 2 para que o líquido que subiu no tubo durante a esterilização reflua para o frasco, evitando que o algodão se molhe. O balão auxiliar ainda não contém meio de cultura.

b) *Passagem de meio para o balão auxiliar e semeadura*

1. Fechar o tubo de escape (pinça 1).
2. Manter aberta a entrada do ar (pinça 2)
3. Abrir o tubo de ligação com o balão auxiliar (pinça 3).
4. Soprar pelo tubo-filtro *a* para iniciar a sifonagem, trasladando o volume de 200 ml aproximadamente. Abrir o tubo-filtro *b* de escape e fechar o tubo de ligação com o balão auxiliar (pinça 3).
5. Semear no balão auxiliar cerca de 5 ml de cultura de tripanossomos de 8 a 12 dias, feita em meio de Rugai & Rugai.
6. Colocar todo o aparelho na estufa a 28°C.
7. Observar o desenvolvimento da cultura no balão auxiliar pela turvação ou ao microscópio, se houver suspeita de contaminação.
8. Desenvolvida a cultura, abrir a pinça 3 e elevar o balão para trasladar o líquido para o frasco e fechar novamente a pinça 3.

Ligar o tubo-filtro *a* ao motor por intermédio de um tubo de borracha e acionar o motor. O fluxo de ar deve ser de 300 a 400 cm³/min., mantido durante todo o tempo de incubação.

9. Observar o desenvolvimento da cultura, trasladando um pouco do líquido para o balão auxiliar, o que se consegue repetindo as operações dos itens 1, 2 e 3 (parte *b*). O líquido reflue pela pressão do motor. Em geral, são necessários de 10 a 15 dias para o desenvolvimento máximo da cultura.

c) *Colheita*

Desligar o motor, retirar o conjunto da estufa e colocar no balão auxiliar 0,7 g de Timerosal dissolvido em 200 ml de álcool etílico e transferi-lo para o frasco. Agitar e deixar em contacto algumas horas. Centrifugar conforme a técnica descrita por Rugai & Rugai.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A técnica descrita foi testada através de 8 partidas de 7 litros de meio cada, com produção média de 1,2 g de tripanossomos secos por partida.

A esterilização de todo o conjunto, inclusive do meio de cultura, o funcionamento em circuito fechado e a utilização do balão auxiliar reduzem ao mínimo as contaminações.

RESUMO

Foi descrita uma técnica para cultura de *Trypanosoma cruzi* em grandes volumes, pelo borbulhamento contínuo de ar.

Cada partida de 7 litros produziu em média 1,2 g de tripanossomos secos.

A técnica pode ser adaptada a maiores volumes de meio de cultura permitindo a produção de tripanossomos em grande quantidade.

Agradecimentos — Agradecemos a colaboração do Dr. Augusto E. Taunay, Dr. Micio de Azevedo, Srs. Marcelina J. Citrângulo, José Brandão e Caetano Zamariolla.

PESQUISA E DOSAGEM DE AFLATOXINA EM AMENDOIM E DERIVADOS E EM OUTROS CEREAIS

SEARCH AND DOSAGE OF AFLATOXIN IN PEANUTS AND DERIVATIVES AND OTHER CEREALS

WALDOMIRO PREGNOLATTO ⁽¹⁾
MYRNA SABINO ⁽¹⁾

Chromatography techniques in paper and in thin layer chromatography are described for the searching and determination of aflatoxin in foods for human consumption, and in rations for animals.

Using these techniques, 32 foods were analysed, of which 20 contained aflatoxin, and 130 rations, where 104 were contaminated

Besides the peanut flour and other peanut products, the manioc flour showed highly contaminated with aflatoxin.

Sodium bisulfite 1:10.000 showed effectual to avoid the development of the *Aspergillus flavus* in the peanut flour.

INTRODUÇÃO

O amendoim, uma importante fonte de proteínas, usado principalmente em rações para aves, é facilmente invadido por cêpos de *Aspergillus flavus*, os quais produzem metabólitos extremamente tóxicos que receberam o nome de Aflatoxinas num relatório apresentado por STENVENSON ao "Interdepartmental Working Party," em 1962 ⁴⁰.

O problema dessas toxinas veio à luz devido a grande perda de peruzinhos ocorrida em 1960 em Granjas da Inglaterra. De fato, nesse ano cerca de 100.000 peruzinhos e patos jovens morreram em poucos meses. As aves afetadas morriam no espaço de uma semana, durante a qual perdiam o apetite, tornavam-se apáticas e perdiam a força das asas.

O exame *post-mortem* evidenciou franca hemorragia no fígado e aumento do rim ⁴⁷.

Simultaneamente, um mal semelhante ocorria na Áustria, Hungria ¹⁷, Uganda,

Kenya ¹⁹. Nestes dois últimos países perderam-se 14.000 patinhos em 4 semanas.

Não somente aves domésticas como perus, patos, faisões, raramente frangos mostravam-se sensíveis a estas toxinas, mas também animais como porcos, veados e carneiros ^{29, 31, 40, 41}.

Inicialmente êste tipo de intoxicação foi atribuído a substâncias tóxicas existentes nos componentes das rações. Rapidamente, porém, estabeleceu-se a ligação entre êste tipo de intoxicação e o uso nas rações de tortas de amendoim procedentes do Brasil, segundo ALLCROFT *et alii* ³ e SARGEANT *et alii* ¹³, os quais mostraram também que dessas tortas tóxicas se podia extrair um princípio ativo que produzia a morte, com os mesmos sintomas verificados na Inglaterra. SARGEANT *et alii* ¹³, mostraram que não eram somente as tortas de amendoim provenientes do Brasil as responsáveis por êsse tipo de intoxicação, mas também as provenientes da Nigéria, África

(1) Da Seção de Química Biológica e Espectrografia do Instituto Adolfo Lutz.

Ocidental, África Oriental, Gâmbia e Índia, o que conduziu as pesquisas para o campo das toxinas. Em setembro de 1960, AUSTWICK & AYERST⁷ observaram a presença de fragmentos de hifas de fungos em algumas tortas, o que levou SARGEANT *et alii*¹⁴ a isolar de uma torta de amendoim de Uganda especialmente tóxica um produto produzido por um fungo, que foi identificado como sendo o *Aspergillus flavus* tendo as mesmas propriedades tóxicas das tortas estudadas. Daí, naturalmente, o nome de aflatoxina dada a esse princípio tóxico por êle elaborado.

WILSON *et alii*¹², estudaram 121 fungos isolados, representando 20 espécies dos quais somente os da espécie *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* produziram aflatoxina, sendo o *Aspergillus flavus* Link é o responsável pela produção de maiores quantidades de aflatoxina.

Outros bolores foram estudados, dos quais o *Penicillium puberulum* Bain produz aflatoxina em pequena quantidade, como demonstraram HODGES *et alii*²² e KULIK & HOLADAY²³ ao encontrarem esse fungo em amostras de amendoim.

Aspergillus flavus é um fungo muito comum, podendo ser facilmente encontrado e isolado em muitos depósitos de gêneros alimentícios tropicais. Eles se desenvolvem muito rapidamente, mas necessitam de um teor de umidade maior que a maioria dos fungos.

Em climas tropicais, onde encontramos normalmente temperaturas de 30° ou mais, este fungo necessita de uma umidade relativa do ar de no mínimo 80% o que corresponde a uma umidade mínima de cerca de 9% na semente do amendoim e de 16% nas farinhas desengorduradas do amendoim.

O desenvolvimento do fungo e, por consequência, a formação da aflatoxina só ocorre numa pequena parte da semente. Este fungo é geralmente distinguido por possuir coloração rosea de carne.

O fungo pode atacar diretamente a semente antes que o processo de secagem diminua a porcentagem da umidade abaixo do limite próprio para o seu desenvolvimento, ou pode ter lugar também em qual-

quer estágio posterior, desde que o teor de umidade e temperatura sejam favoráveis. A secagem posterior não afeta o teor de aflatoxina já produzido, pois ela resiste às condições de secagem e até mesmo ao processo de torração.

Enquanto as sementes estão nas cascas, são e em estado de crescimento, e o teor de umidade é demasiado alto, cerca de 25%, elas não são atacadas pelo fungo, pois possuem um mecanismo protetor, que pode ainda ser suplementado pelas barreiras físicas representadas pela própria casca e tegumentos.

Mas, se se deixar que os grãos amadureçam além do ponto normal de maturação, o ataque do fungo pode ocorrer com sérios riscos então para a qualidade do grão ocasionando ainda a queda das barreiras naturais de proteção da semente.

O *Aspergillus flavus* considerado como uma espécie cosmopolita do solo, das matérias orgânicas e dos grãos, especialmente os oleosos, é abundantemente encontrado no amendoim e seus derivados^{8, 20, 27, 45}, e ainda no feijão, arroz, mandioca^{34, 38}, também nas tortas de algodão^{18, 28, 30, 39}, e raramente no milho²⁵.

Também já foi encontrado no trigo, soja, girassol e seus derivados, como sejam farinhas, pastas etc.^{2, 9, 24, 3, 37}.

Diversas toxinas com propriedades físico-químicas muito semelhantes às da aflatoxina têm sido encontradas por diversos autores: ALLARD⁴ mostrou que *Aspergillus versicolor* (Vuil) Tirab é capaz de produzir aflatoxina entre seus metabólitos, mas BULLOCK *et alii*¹¹ mostrou que pode ter havido confusão com a sterigmatocystina e aversina, substâncias com propriedades muito semelhantes às da aflatoxina.

Também o fungo *Macrophomina phaseoli* produz uma toxina parecida com a aflatoxina, como o demonstrou CROWTHER¹⁶ que também descreveu uma técnica simples em C.C.D. pela qual se podem diferenciar estas toxinas.

Muito numerosos são os metabólitos produzidos por *Aspergillus flavus*, como verificaram ASAO *et alii*⁶ e ARMBRECHT *et alii*⁴, porém, os mais conhecidos e mais

tóxicos são os do grupo B e G, assim classificados em função de apresentarem fluorescência característica azul e verde respectivamente, quando observados sob luz ultravioleta.

Em 1963, COOMES & SANDERS¹⁵ separam, por cromatografia em papel, aflatoxina B e G para, em seguida, um grupo de investigadores da Inglaterra — BROADBENT, CORNELIUS & SHONE¹⁰, NESBITT *et alii*³⁵, VAN DER ZIJDEN *et alii*⁵⁰ isolarem finalmente por C.C.D. 4 toxinas, respectivamente aflatoxina B₁, aflatoxina B₂, aflatoxina G₁ e aflatoxina G₂. Logo em seguida HARTLEY, NESBITT & O'KELLY²¹ estabelecem as fórmulas moleculares dessas substâncias, para ASAO *et alii*^{5, 6} proporem a fórmula estrutural das aflatoxinas B₁ e G₁ e CHANG *et alii*¹², VAN DORP *et alii*⁵¹ proporem as da B₂ e G₂.

Os espectros característicos das 4 aflatoxinas foram estabelecidos por diversos investigadores^{5, 6, 21, 50, 51}.

Métodos, quer sejam químicos ou biológicos, são abundantemente encontrados na literatura. Esses métodos baseiam-se sempre na extração da toxina com solventes adequados e separação cromatográfica em papel^{10, 15}, ou em camada delgada^{10, 14, 21, 26, 35, 50}, subsequente determinação por espectrofotometria no ultravioleta ou por fluorometria.

Dos métodos descritos na literatura o que oferece melhores resultados é o estabelecido por LEE²⁶, como ficou demonstrado no "Istituto Superiori di Sanità"¹⁴, método esse que adaptamos aos nossos trabalhos de rotina na determinação das aflatoxinas.

Para quem não dispõe porém de equipamento para cromatografia em camada delgada, estabelecemos um método rápido e mais simples por cromatografia em papel, que dá resultados aceitáveis, mas não tão bons como quando se trabalha em C.C.D.

MATERIAL E MÉTODOS

A determinação da aflatoxina envolve as seguintes operações:

1. Preparo da amostra
2. Extração de aflatoxina
3. Separação cromatográfica dos metabólitos
4. Avaliação

1. MATERIAL

Silica gel para C.C.D., Merck

Clorofórmio p.a.

Éter dietílico p.a livre de peróxidos (éter anestésico Rhodia)

Metanol p.a.

Acetona

Solventes

Clorofórmio-metanol (97:3)

(para a cromatografia em C.C.D.)

Água-éter-acetona-metanol (3:1:1:1)
(para a cromatografia em papel)

Silicato de sódio

Cubas e equipamentos para cromatografia em papel e em C.C.D.

2. MÉTODOS

1. *Preparo da amostra* — Para material desengordurado, ou contendo pequena quantidade de gordura, basta moer muito bem e homogeneizar; quando porém o material contém mais de 4% de gordura, extrair em Soxhlet com éter de petróleo (30-60°C) por 6 horas. Secar o resíduo em estufa a 45°C.

2. *Extração da aflatoxina* — Pese 25g do material, transfira para copo de 300 ml e umideça com água fervente, cuidadosamente até que se forme uma pasta: deixe em repouso por 10 minutos, e adicione aos poucos e cuidadosamente à pasta 100 ml de clorofórmio, com constante homogeneização; deixe em agitação fraca e constante por 30 minutos, filtre a vácuo recolhendo

o filtrado em balão de 100 ml, lave o resíduo com 10 ml de clorofórmio e complete o volume com clorofórmio. Evapore cuidadosamente o clorofórmio em banho-maria até secar, tendo o cuidado de evaporar as últimas porções em corrente de nitrogênio. Dissolva o resíduo em 10 ml de clorofórmio.

3. CROMATOGRAFIA

a) *Em camada delgada*

Use placas de 20 x 20 com camada de sílica gel de 400 μ , secadas ao ar por 30 minutos e ativada em estufa a 105°C por 2 horas.

Transfira para a placa de 30 a 600 microlitros de extrato clorofórmico e desenvolva o cromatograma com clorofórmio-metanól (97:3), até a altura de 12 cm da base; seque ao ar e observe sob luz ultra-violeta, marque os Rf. Desenvolva novamente a placa com éter como solvente: as manchas devem permanecer nas mesmas posições (deslocamento das manchas indicam que as mesmas não eram de aflatoxina). Nestas condições, observam-se, sob luz fluorescente, 4 manchas que correspondem às 4 aflatoxinas conhecidas, B₁, B₂,

G₁, G₂, nos respectivos Rf de 0,65, 0,60, 0,50 e 0,34.

b) *Em papel*

Impregne tiras de papel Whatman nº 1 de 20 x 5 cm, em solução de silicato de sódio a 2% p/v e seque-as em estufa a 100°C por 1 hora. Transfira para o papel de 30 a 600 microlitros do extrato clorofórmico e desenvolva o cromatograma com água-éter-acetona-metanól (3:1:1:1) até atingir a altura de 12 cm da base. Seque ao ar e observe sob luz ultra-violeta. A mancha com Rf de 0,70 corresponde a aflatoxina B₁, a com Rf de 0,60 à B₂ e, no Rf de 0,35, aparecem as G₁ e G₂ juntas.

4. AVALIAÇÃO — Aflatoxina B₁ e B₂

Raspe a camada de sílica da placa ou recorte o papel em tiras que correspondem às toxinas B₁ e B₂ e elua-as em 2 ml de metanól por contato e durante 30 minutos. Filtre, lave o resíduo com 2 ml de metanól recolhendo o filtrado e o álcool de lavagem em cuba apropriada (cuba de 10 mm do Beckmann DU). Leia a absorbância dessas soluções a 363 e 420 m μ , usando como branco o metanól previamente tratado com a sílica ou o papel usados na cromatografia e que sofreu o mesmo tratamento.

Cálculo

$$\frac{(A_{363} - A_{420}) \times 4 \times 312}{22\ 000} = X \text{ mg aflat. em } 4 \text{ ml metanol}$$

$$X \text{ mg aflat.} \times \frac{10}{0,6} = y \text{ mg de aflat. em } 10 \text{ ml de clorofórmio, que corresponde a } 25 \text{ g da amostra}$$

$$Y \text{ mg aflat.} \times 40 = \text{mg por quilo da amostra}$$

P.M. Aflat, B₁ = 312

Coefficiente molar extinção de B₁ = 22 000

Para a determinação da aflatoxina em certos alimentos ricos em gordura e/ou em carboidratos, torna-se necessário purificar previamente a amostra.

Para isso, transfira-se 25 g da amostra já moída e homogeneizada para copo de 600 ml, junte 150 ml de etanol a 95%

e agite durante 5 minutos com agitador mecânico.

Filtre através Buchner a vácuo, lave o resíduo com cerca de 100 ml de etanol, recolhendo filtrado e álcool de lavagem em balão de 250 ml, complete o volume com etanol e homogeneize.

Transfira para funil de separação de 250 ml, 25 ml dessa solução, junte 10 ml de HCl N, e extraia as substâncias lipossolúveis com 2 vezes 25 ml de tetracloreto de carbono. Adicione à fase alcoólica 65 ml de HCl N e extraia daí as toxinas com 3 vezes 20 ml da mistura clorofórmio-éter (9:1), à qual se junta 2 g de sulfato de sódio anidro e, em seguida, 2 g de sílica gel. Filtre através de Gooch de placa porosa contendo 5 g de óxido de alumínio cromatográfico, lavando o resíduo com 20 ml de clorofórmio. Evapore o líquido em cápsula de porcelana em banho-maria cuidadosamente até secura. Dissolva o resíduo em 0,5 ml de clorofórmio e cromatografe.

MEIOS DE EVITAR A CONTAMINAÇÃO E COMO DESTRUIR A AFLATOXINA

Derivados dos lipídios do amendoim, tais como o óleo e as pastas gordurosas, apresentam-se livres de aflatoxina como já havia sido verificado por PARKER & MELNICK³⁶, de acôrdo, aliás, com as observações de SHIMKIN & KRAYBILL⁴⁶ e SPENSLEY⁴⁸, que verificaram ser a aflatoxina destruída no processo de refinação dos óleos, ao serem êstes lavados com álcali.

Nas farinhas contaminadas, é impossível destruir a aflatoxina por meios práticos.

A contaminação de farinhas elaboradas a partir de amendoim não contaminado pode ser evitada pela adição de bissulfito de sódio, na proporção de 1:10 000; de fato, farinhas puras às quais juntamos bissulfito naquela proporção, mantidas em ambiente ideal para o desenvolvimento do fungo e posteriormente contaminadas, não apresentaram depois de 1 mês quaisquer traços de aflatoxina, enquanto que a farinha testemunho apresentou-se com mais de 15 p.p.m. de aflatoxina. Propionato de cálcio também impede o desenvolvimento do fungo, mas em quantidades anti-econômicas, enquanto que o benzoato de sódio não exerce qualquer ação inibidora.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por cromatografia em C.D. e em papel consegue-se separar perfeitamente as aflatoxinas existentes em produtos naturais.

Produtos de amendoim analisados mostraram-se um alto teor de aflatoxina, sendo que, raramente, se encontrou uma amostra negativa.

Isso evidencia a precariedade das condições higiênicas na conservação do amendoim e na elaboração de derivados; o problema torna-se ainda mais grave quando se verifica que não só as farinhas de amendoim destinadas à fabricação de rações animais mas também praticamente todos os produtos destinados ao consumo humano evidenciaram alto teor em aflatoxina B₁: “pé de moleque”, “paçoca”, amendoim cru e torrado de várias regiões, amendoim salgado e “amendoim japonês” mostraram-se contaminados.

Além de amendoim e seus produtos procurou-se positivar a aflatoxina em outros produtos e farinhas e com surpresa verificamos estarem as farinhas de mandioca altamente contaminadas; a quantidade de aflatoxina na farinha de mandioca em alguns casos era tão alta que em farinhas de trigo, quando esta continha 10% de farinha de mandioca, podia-se separar e identificar a aflatoxina.

Nozes, castanhas do Pará, castanha de cajú, farinhas de algodão, milho, trigo, soja, sorgo foram analisadas e tôdas se apresentaram livres desta toxina; por outro lado, rações para carneiros, coelhos, cobaias e cavalos mostraram-se contaminadas e ainda, em farinha de gergelim e rações para cavalo, evidenciou-se toxinas que possuíam tôdas as características da esterigmatocistina.

Pela análise destes resultados, chegamos à conclusão de que o desenvolvimento de fungos em certos alimentos naturais é sério, o que naturalmente não é de se estranhar, pois sabemos muito bem quão precárias são as condições de higiene em alguns depósitos e fábricas destes produtos.

RESUMO

Descrevem-se técnicas de cromatografia em papel e em camada delgada para pesquisa e determinação de aflatoxina em alimentos para consumo humano e em rações para animais.

Usando essas técnicas foram analisados 32 alimentos, dos quais 20 continham aflatoxina, e 130 rações das quais 104 estavam contaminadas.

Além da farinha de amendoim e outros produtos de amendoim, a farinha de mandioca mostrou-se altamente contaminada com aflatoxina.

Bissulfito de sódio a 1:10 000 mostrou-se efetivo para evitar o desenvolvimento do *Aspergillus flavus* na farinha de amendoim.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLARD, C. — Modalités de la production des aflatoxines. Phytiat. — Phytopharm 14:81-7, 1965.
2. ALLCROFT R. & CARNAGHAN, R. B. A. — Toxic products in groundnuts: biological effects. Chem. Ind. 2:50-3, 1963.
3. ALLCROFT, R.; CARNAGHAN, R. B. A.; SARGEANT, K. & O'KELLY, J. — A toxic factor in Brazilian groundnut meal. Vet. Rec. 73:428-9, 1961.
4. ARMBRECHT, B. K.; HODGES, F. A.; SMITH, H. R. & NELSON, A. A. — Mycotoxins. I. Studies on aflatoxin derived from contaminated peanut meal and certain strains of *Aspergillus flavus*. J. Ass. Off. Agric. Chem. 46:805, 1963.
5. ASAO, T.; BUCHI, G.; ABDEL-KADER, M. M.; CHANG, S. B.; WICK, E. L. & WOGAN, G. N. — The structures of aflatoxins B and G₁.
6. ASAO, TOYOMOBU *et alii* — Aflatoxins B and G. J. Am. Chem. Soc. 85(11):1706-7, 1963.
7. AUSTWICKS, P. K. C. & AYERST, G. — Toxic in groundnuts: groundnut microflora and toxicity. Chem. Ind. 2:55-61, 1963.
8. BAMPTON, S. S. — Growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in groundnuts. Trop. Sci. 5:74-81, 1963.
9. BIXLER, E. & LOPEZ, L. C. — Estudios preliminares em aves sobre la toxicidad de los granos atacados por *Aspergillus flavus*. Técnica Pecuária en Mexico, n.º 2, p. 27-9, 1963. Apud MOREAU, C. 32.
10. BROADBENT, J. H.; CORNELIUS, J. A.; SHONE, G. — The detection and estimation of aflatoxin in groundnuts and groundnut materials. Part II. Thinlayer chromatographic procedure. Analyst, Lond. 88:214, 1963.
11. BULLOCK, E.; KIRKALDY, D.; ROBERTS, J. C. & UNDERWOOD, J. G. — Studies in mycological chemistry. Two new metabolites from a variant strain of *Aspergillus versicolor* (Vuillemin) Tiraboschi. J. Chem. Soc. 155:829-35, 1963.
12. CHANG, S. B.; ABDEL, KADER, M. M.; WICK, E. L. & WOGAN, G. N. — Aflatoxin B₂: chemical identity and biochemical activity. Science, N. Y. 142:1191-2, 1963.
13. CHINDEMI, A. & CULTRERA, A. — Considerazioni sui metodi di determinazione dell'aflatoxina B₁ nei semididi arachide e nei prodotti derivati. Boll. Labor. Chim. Provin. 17(1):59-75, 1966.
14. Circolare Ministero della Sanita, del 13 Settembre 1965, n.º 702/8434/202. Apud CHINDEMI, A. 13.
15. COOMES, T. J. & SANDERS, J. C. — The detection and estimation of aflatoxin in groundnut materials. Part I: paper chromatographic procedure. Analyst 88:209, 1963.
16. CROWTHER, P. G. — Metabolite of *Macrophomina phaseoli* (Maubl) Ashby with thin-layer chromatographic behavior similar to that of aflatoxin B. Analyst 93:623-4, 1968.
17. DERZSY, D.; MESZAROS, J.; PROKOPOVITSCH, L.; TOT-HBARANY, I. — (Virus hepatitis and toxic hepatitis caused by groundnut meal induck in Hungary). Magy. Allatorv. Lap. 17:49-53, 1962.
18. ENGBRECHET, R. H.; AYRES, J. L. & SINNHUBER, R. O. — Isolation and determination of aflatoxin B₁ in cottonseed meals. J. Ass. Off. Agric. Chem. 48:815-8, 1965.
19. HAIG, D. A. — (Communication personelle á Carnaghan et Sargeant) 1961. Apud MOREAU, C. 32.
20. HARCKNESS, C.; McDONALD, D.; STONEBRIDGE, W. C.; A'BROOK, J. & DARLING, H. S. — The problem of mycotoxins in groundnuts and other food crops in tropical Africa. Ed. Technol., Lond. 20:72-8, 1966.
21. HARTLEY, R. O.; NESBITT, B. F. & O'KELLY, J. — Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature, Lond. 198:1056-8, 1963.
22. HODGES, F. A.; ZUST, J. R.; SMITH, H. R.; NELSON, A. A.; ARMBRECHT, B. H. & CAMPBELL, A. D. — Mycotoxins; aflatoxin isolated from *Penicillium puberulum*. Science, N. Y. 145: 1439, 1964.
23. KULIK, M. M. & HOLADAY, C. E. — Aflatoxin: a metabolic product of several fungi. Mycopat. Mycol. Appl. 30:137-40, 1966.

24. LAFONT, P. — Les mycotoxines produites par les *Aspergilli* differents d'*A.flavus*. Colloque aflatoxines, Villejuif, 7 mars, 1966.
25. LAFONT, P. — Pollution par *Aspergillus flavus* de produits vegetaux europeens. Colloque aflatoxines, Villejuif, 7 mars, 1966.
26. LEE, W. — Quantitative determination of aflatoxin in groundnut products. Analyst 90:305-7, 1965.
27. LIM HAN KUO & YEP GIM SAI-THE — The occurrence of aflatoxin in Malayan imported oil cakes and groundnut kernels. Malay. Agric. J 45:232-44, 1966.
28. LOOSMORE, R. M.; ALLCROFT, R.; TUTTON, E. A. & CARNAGHAN, R. B. A. — The presence of aflatoxin in a sample of cottonseed cake. Vet. Rec. 76:64-5, 1964.
29. LOOSMORE, R. M. & HARDING, J. D. J. — A toxic factor in Brazilian groundnut causing liver damage in pigs. Vet. Rec. 73:1362-4, 1961.
30. MAYNE, R. J.; PONS, W. A.; FRANZ, A. O. & GOLDBLATT, L. A. — Elaboration of aflatoxin on cottonseed products by *Aspergillus flavus*. J. Am. Oil Chem. Soc. 43:251-3, 1966.
31. MINNE, A. J.; ADELAAR, T. F.; TERBLANCHE, M. & SMITH, J. D. — Vet. Bull. T. XXXIV, p. 516, 1946. Apud MOREAU, C.³².
32. MOREAU, C. — Moisissures toxiques dans l'alimentation. Paris, Lechevalier, 1968.
33. MOREAU, C. & MOREAU, M. — Pollution fongique de l'atmosphère. Sa responsabilité dans les alterations de quelques denrées alimentaires. Bull. Soc. Mycol. Fr. 75(1):72-9, 1959.
34. NARTEY, F. — Aflatoxins of *Aspergillus flavus* grow on cassava. Physiol. Pl. 19:818-22, 1966.
35. NESBITT, B.; O'KELLY, J.; SARGEANT, K & SHERIDAN, A. — Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature Lond. 195:1062-3, 1962.
36. PARKER, W. A. & MELNICK, D. — Absence of aflatoxin from refined vegetable oils. J. Ass. Off. Agric. Chem. 49:635, 1966.
37. PELHATE, J. — Moisissures dangereuses dans l'alimentation animale. C. R. Hebd. Séanc. Acad. Agric. Fr. 52:850-5, 1966.
38. PETIT, J. P.; REVIERE, R.; PERREAU, P. & PAGOT, J. — Recherches sur l'aflatoxine. Revue des travaux effectués pendant le premier semestre 1964 dans les laboratoires centraux de l'I.E.M.V.T. — Rev. Elev. Vét. Pays Trop. 17:239-53, 1964.
39. PONS, W. A. & GOLDBLATT, L. A. — The determination of aflatoxins in cottonseed products. J. Am. Oil Chem. Soc. 42(1):475, 1965.
40. RAYNAUD, J. P. — Une épidémie d'hépatite cirrhotique du porc sévissant à Madagascar. Étude des tests hépatiques chez le porc et utilisation de la vitesse de sédimentation pour un diagnostic précoce. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop. 16:429-37, 1961.
41. Rep. of the Secretary to the Federal Ministry of Agriculture in Rhodesia and Nyasaland for the year end 20th sept. 1961. Vet. Bull., t. XXXIII, p. 215, 1961. Apud MOREAU, C.³².
42. SARGEANT, K.; ALLCROFT, R. & CARNAGHAN, R. B. A. — Groundnut toxicity. Vet. Rec. 73:865, 1961.
43. SARGEANT, K.; O'KELLY, J.; CARNAGHAN, R. B. A. & ALLCROFT, R. — The assay of a toxic principle in Brazilian groundnut meal. Vet. Rec. 73:1219-23, 1961.
44. SARGEANT, H.; SHERIDAN, A.; O'KELLY, J. & CARNAGHAN, R. B. A. — Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature, Lond. 192:1096-7, 1961.
45. SERRES, H. — La toxicité de certains tourteaux d'arachede Y Madagascar. Bull. Madagascar 209:575-80, 1963. Apud MOREAU, C.³².
46. SHIMKIN, M. B. & KRAYBILL, H. F. — (Non toxicité de l'huile d'arachide). J. Am. Med. Ass. 184:57, 1963.
47. SILLER, W. G. & OSTLER, D. C. — The histopathology of an enterohepatic syndrome of turkey poultry. Vet. Rec. 73:134-8, 1961.
48. SPENSLEY, P. C. — L'aflatoxine, principe actif de la maladie "X" du dindon. Endeavour 22:75-9, 1963.
49. STENVENSON, D. E. — Toxicity associated with certain batches of groundnuts. Br. Vet. J. 118:531-2, 1962.
50. VAN DER ZIJDEN, A. S. M.; KOELENMID, W. A. A. B.; BOLDING, J.; BARRET, C. B.; ORD, W. O. & PHILIP, J. — Isolation in crystalline form of a toxin responsible for turkey X disease. Nature, Lond. 195:1060-2, 1962.
51. VAN DORP, D. A.; VAN DER ZIJDEN, A. S. M.; BEERTHUIS, R.F.; SPARRE BOOM, S.; ORD, W. O.; De IONGH, H. & KENNING, R. — Dihydro-aflatoxin B₁ a metabolite of *Aspergillus flavus*. Recl. Trav. Chim. Pays. Bas, Belg. 82:587-92, 1963.
52. WILSON, B. J. et alii — Investigation of reported aflatoxin production by fungi outside the *Aspergillus flavus* group. Appl. Microbiol. 16:819, 1968.

EMPREGO DA TÉCNICA DE KOLMER, MODIFICADA, NA FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO, USANDO ANTÍGENO METÍLICO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

MODIFIED KOLMER COMPLEMENT FIXATION TEST, USING METHANOLIC ANTIGEN OF *TRYPANOSOMA CRUZI*, IN CHAGAS' DISEASE DIAGNOSIS

OCTAVIO BARACCHINI ⁽¹⁾
MANOEL DE BRITTO E SILVA ⁽²⁾

SUMMARY

A modified Kolmer complement fixation test using methanolic antigen of *T. cruzi* prepared according Baracchini *et alii*, 1966 is described. The related test was adapted for the use of methanolic antigen of *T. cruzi*, that nowadays is the more practical because of its stability at room temperature, economy, rapid and easy preparation, besides its good especificity and sensibility.

The principal aim of the authors is just to give the possibility of any laboratory, to work on Chagas' disease serology using a simple and good technique.

INTRODUÇÃO

A sorologia da Doença de Chagas é uma das solicitações mais constantes nos laboratórios de Saúde Pública do Estado de São Paulo e do Brasil. Essa demanda cresce dia a dia em função da maior atenção dispensada pelas autoridades sanitárias brasileiras ao importante problema da infecção chagásica. Necessário é, portanto, que se desenvolvam técnicas sorológicas seguras e de fácil execução, para que qualquer laboratório com atividade polivalente possa participar ativamente no levantamento sorológico da doença de Chagas na comunidade brasileira.

O presente trabalho visa justamente a descrição de uma técnica proposta por KOLMER⁶ para o sistema sífilis. A referida técnica foi adaptada para o sistema Chagas, usando-se como antígeno, o antígeno metílico preparado segundo BARACCHINI *et alii*³.

Os estudos comparativos realizados entre a técnica que apresentamos (com 100% de hemólise) e a de FREITAS & ALMEIDA⁵ (com 50% de hemólise) e com testes de imunofluorescência, permitiram a sua indicação para a rotina dos trabalhos sorológicos da Doença de Chagas nos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz.

A introdução do antígeno metílico de *T. cruzi* na sorologia na Doença de Chagas por BATISTA & SANTOS⁴ e BARACCHINI *et alii*³, modificou por completo a situação do diagnóstico sorológico da infecção chagásica. Anteriormente à publicação dos autores citados, poucos eram os laboratórios que podiam trabalhar em sorologia da doença de Chagas, pois os antígenos aquosos utilizados, apesar da boa especificidade, não são estáveis, são pouco econômicos e de preparo demorado.

Além disso, como verificaram ALMEIDA¹ e ALMEIDA *et alii*², os antígenos

(1) Professor Catedrático de Microbiologia e Saúde Pública da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto e Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Médico Chefe da Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz.

aquosos de *T. cruzi* são menos sensíveis do que os antígenos metílicos e ainda são ricos em inibidores específicos para a infecção chagásica quando empregados em testes de reação de fixação de complemento.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do sôro

Após a colheita e a coagulação do sangue, o sôro é separado por centrifugação e inativado pelo aquecimento a 56°C, durante 30 minutos. Os soros previamente inativados devem ser reaquecidos a 56°C, por 10 minutos, no dia da prova. O sôro que apresentar partículas em suspensão após a inativação deve ser novamente centrifugado.

No caso especial de o sôro humano normal conter anticorpos hemolíticos naturais para os glóbulos de carneiro, êsses anticorpos podem ser removidos empregando-se a seguinte técnica:

a) Coloca-se 1 ml de sôro humano em um tubo de 75 x 12 mm e leva-se êste tubo ao refrigerador a + -4°C, durante 15 minutos.

b) Ao sôro em questão adiciona-se uma gôta de papa de glóbulos de carneiro lavados e concentrados.

c) Leva-se novamente o tubo ao refrigerador por mais 15 minutos.

d) Após a incubação em geladeira, o sôro tratado pelos glóbulos de carneiro é centrifugado e o sobrenadante estará pronto para o uso.

Sôro anticomplementar

O sôro anticomplementar pode ser novamente testado preparando-se diluições seriadas em progressão geométrica. Para cada diluição do sôro são preparados dois tubos; um, funcionando como tubo testemunha e o outro, de reação. A primeira diluição que apresentar, na prova qualitativa, hemólise completa no tubo testemunha e reação fortemente positiva, no tubo reação, permite concluir que se trata de um sôro *reagente*; caso contrário, o sôro é dotado de forte atividade anticomplementar.

Glóbulos de carneiro

Os glóbulos de carneiro podem apresentar maior ou menor resistência à ação hemolítica do complemento e da hemolisina. Como os glóbulos de carneiro participam na reação como indicador da fixação do complemento no complexo antígeno anticorpo, é necessário estabelecer-se um controle adequado dêste componente da reação.

A contaminação bacteriana tem papel importante na conservação dos glóbulos de carneiro e daí a importância de se trabalhar nas melhores condições de assepsia possível desde a colheita dos glóbulos até a sua utilização final.

Colheita do sangue

Sangrar o carneiro na veia jugular, com todos os cuidados de assepsia, colhendo o sangue diretamente sobre a solução citratada (B.R.K.) na proporção de 1/1.

Solução B.R.K.

Citrato de sódio	8,0 g
Cloreto de sódio	4,2 g
Glicose anidra	20,5 g
Solução 10% de ácido cítrico	8,0 ml
Água destilada q. s. p.	1 000,0 ml

Ajustar o pH a 6.1 com solução de ácido cítrico. Esterilizar em autoclave a 110°C, por 15 minutos. Juntar então 0,002 g de estreptomicina para cada ml de solução.

Tampão de barbitúrico (5 vezes isotônico)

Cloreto de sódio	83,80 g
Bicarbonato de sódio	2,52 g
Dietilbarbiturato de sódio	3,0 g
Ácido dietilbarbitúrico	4,5 g
Água destilada q.s.p.	2 000,0 ml

Dissolver o ácido dietilbarbitúrico em 500 ml de água destilada quente e adicionar à solução os outros componentes. Esfriar e completar o volume.

Para o preparo da solução tampão, tomar 200 ml da fórmula 5 vezes isotônica e completar o volume para 1 000 ml com água destilada.

Preparo da suspensão de glóbulos padronizada

1. Os glóbulos de carneiro devem ser conservados em geladeira e só usados 48 horas após a colheita em solução B.R.K., 1/1.

2. Os glóbulos de carneiro, antes de serem utilizados, devem ser filtrados em gaze.

3. Os glóbulos filtrados são diluídos em solução tampão na proporção de 1/3. Os tubos são centrifugados a 2 000 r.p.m., durante 5 minutos.

4. Decanta-se o sobrenadante, procurando-se retirar também os glóbulos brancos que constituem a parte superior do sedimento.

5. Adiciona-se nova quantidade de solução tampão, ressuspendem-se os glóbulos e os tubos são novamente centrifugados. Esta operação deve ser repetida mais duas vezes.

6. Após a última lavagem dos glóbulos, estes são transferidos para tubos graduados de 15 ml e centrifugados a 2 000 r.p.m., durante 15 minutos.

7. Lê-se o volume dos glóbulos sedimentados nos tubos graduados de 15 ml e retira-se cuidadosamente o líquido sobrenadante.

8. Com o sedimento, prepara-se uma suspensão de glóbulos, a 2%, multiplicando-se por 49 o resultado da leitura do sedimento no tubo graduado.

Suponhamos que a leitura do sedimento no tubo graduado foi igual a 2,1 ml. Então, $2,1 \text{ ml} \times 49 = 102,9 \text{ ml}$ de solução tampão necessária para se obter uma suspensão, a 2%, de glóbulos de carneiro.

9. Coloca-se exatamente 15 ml de suspensão de glóbulos, a 2%, em um tubo graduado de 15 ml e centrifuga-se, durante

10 minutos, a 2 000 r.p.m. Se a suspensão de glóbulos estiver convenientemente preparada, ela produzirá um sedimento igual a $0,3 \text{ ml} \pm 0,1 \text{ ml}$.

Nota: Quando o volume dos glóbulos está aquém ou além dos limites estabelecidos, deve-se corrigir a concentração dos mesmos. A fórmula abaixo permite estabelecer a quantidade de tampão que deve ser eliminada ou adicionada à suspensão de glóbulos.

Exemplo 1

Volume da suspensão de glóbulos a 2% = 100 ml

Leitura obtida em tubo graduado de 15 a 1 = 0,27 ml

$$\frac{0,27 \text{ ml}}{0,3 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} = 90 \text{ ml}$$

Assim, da suspensão de glóbulos a 2% preparada, devem ser retirados 10 ml de líquido sobrenadante.

Exemplo 2

Volume da suspensão de glóbulos = 100 ml

Leitura obtida no tubo graduado de 15 ml = 0,33 ml

$$\frac{0,33}{0,3} \times 100 = 110 \text{ ml}$$

A suspensão de glóbulos de carneiro preparada deve-se adicionar 10 ml de solução tampão.

10. A suspensão de glóbulos de carneiro deve ser conservada em geladeira e antes do seu uso o recipiente deve ser agitado convenientemente, a fim de assegurar uma suspensão uniforme.

A suspensão de glóbulos de carneiro pode também ser padronizada colorimetricamente da maneira seguinte:

a) Após a última lavagem dos glóbulos de carneiro em tubo graduado, ler o volume do sedimento e multiplicar por 49.

O resultado traduz a quantidade de solução tampão a ser adicionada ao sedimento para se ter uma suspensão de glóbulos a 2%.

b) Tomar 0,2 ml da suspensão de glóbulos e adicionar a 1,8 ml de água destilada, em um tubo (12 x 75). Medir a densidade ótica pelo fotômetro (Evans) usando filtro 530 (verde-amarelo), tendo como *blank* água destilada, ajustado a densidade ótica zero.

c) A densidade ótica de uma suspensão a 2% de glóbulos de carneiro oscila entre 0,24 e 0,27.

d) Se a densidade estiver fora desses limites, acertar o volume da suspensão aplicando a seguinte fórmula:

$$V. = \frac{V_o \times D_o}{0,26}$$

onde:

V. é o volume desejado.

V_o é o volume preparado.

D_o é a densidade ótica média.

e) Quando D_o é maior do que 0,27, corrigir a suspensão, juntando solução tampão num volume igual (V. — V_o).

f) Quando D_o é menor do que 0,24, a suspensão está muito diluída; então V. é menor do que V_o. Neste caso, deve-se retirar por centrifugação da suspensão de glóbulos uma quantidade de solução tampão igual (V_o — V.).

g) Depois de corrigida a suspensão, determinar novamente a densidade ótica como em b. Uma vez verificada a correção, a suspensão deve ser conservada em geladeira até o seu uso dentro de 24 horas.

Titulação da hemolisina

Diluir a hemolisina a 1/100 como segue:

Hemolisina glicerinada . . . 2 ml
tampão 94 ml
fenol a 5% em salina 4 ml

Da solução estoque, preparar diluição a 1/1 000 de hemolisina adicionando num tubo de ensaio 4,5 ml de tampão, mais 0,5 ml da solução estoque. Agitar bem, colocar numa estante 10 tubos de ensaio (12 x 75, numerados de 1 a 10. Pipetar 0,5 ml da solução de hemolisina a 1/1 000 nos primeiros 5 tubos. A seguir, proceder como no quadro I.

QUADRO I

Tubo n.º	Hemolisina 1/1 000 ml	Solução tampão ml	T é c n i c a	Diluição
1	0,5	0	1: 1.000
2	0,5	0,5	misturar e desprezar 0,5 ml	1: 2.000
3	0,5	1,0	misturar e transferir 0,5 ml ao tubo 6 - desprezar 0,5 ml	1: 3.000
4	0,5	1,5	misturar e transferir 0,5 ml ao tubo 7 - desprezar 1 ml	1: 4.000
5	0,5	2,0	misturar e transferir 0,5 ml ao tubo 8 - desprezar 1,5 ml	1: 5.000
6	0	0,5	misturar e transferir 0,5 ml ao tubo 9	1: 6.000
7	0	0,5	misturar e transferir 0,5 ml ao tubo 10	1: 8.000
8	0	0,5	misturar e desprezar 0,5 ml	1:10.000
9	0	0,5	misturar e desprezar 0,5 ml	1:12.000
10	0	0,5	misturar e desprezar 0,5 ml	1:16.000

Adicionar 0,3 ml de 1 diluição de complemento a 1:30 a cada um dos tubos.

Adicionar 1,7 ml de tampão a cada tubo e 0,5 ml de glóbulos de carneiro a 2%.

Agitar bem e colocar a estante com os tubos em banho-maria a 37°C por 60 minutos.

Leitura

O tubo contendo a diluição mais alta de hemolisina que apresentar hemólise total conterá uma unidade de hemolisina.

Do resultado obtido, a hemolisina 1:100 será diluída de maneira a conter 5 unidades em 0,5 ml. Por exemplo: se a diluição mais alta de hemolisina que deu hemólise completa foi a diluição 1: 4 000, indica que 0,5 ml contem *uma unidade*. Então 0,5 ml da diluição 1:800 contém 5 unidades.

Assim, 10 ml da solução de hemolisina a 1:100 mais 70 ml de tampão seria a diluição a ser empregada na reação.

Complemento

Esse componente da reação é o mais instável de todos e o maior responsável pelos problemas que ocorrem nas reações de fixação de complemento. Atualmente, o comércio especializado dispõe desse elemento que é conservado no estado liofilizado; no entanto, antes do seu emprego na reação propriamente dita, recomendamos a sua re-titulação.

Titulação do complemento

Adicionar 1 ml de complemento a 29 ml de tampão.

Colocar numa estante 10 tubos (12 x 75) numerados de 1 a 10. Seguir o quadro II.

QUADRO II

Titulação do complemento

Tubo n.º	Complemento 1:30	Antígeno diluído	Solução tampão	Incubação	Hemolisina	Glóbulos de	Incubação
1	0,10	0,5	1,4	1 hora a 37°C — Banho-maria	0,5	0,5	1/2 hora a 37°C — Banho-maria
2	0,15	0,5	1,4		0,5	0,5	
3	0,20	0,5	1,3		0,5	0,5	
4	0,25	0,5	1,3		0,5	0,5	
5	0,30	0,5	1,2		0,5	0,5	
6	0,35	0,5	1,2		0,5	0,5	
7	0,40	0,5	1,1		0,5	0,5	
8	0,45	0,5	1,1		0,5	0,5	
9	0,50	0,5	1,0		0,5	0,5	
10	—	—	2,5		—	0,5	

Determinar a menor quantidade de complemento que dá hemólise completa. Esta será a *unidade exata do complemento*. A unidade cheia contém 0,05 ml a mais de

complemento. Duas unidades cheias são requeridas para o teste propriamente dito. Estas podem ser determinadas como no quadro III.

QUADRO III

Complemento 1:30 ml	Hemólise	Unidade do Complemento
0,50	completa	—
0,45	completa	cheia
0,40	completa	exata
0,35	parcial	—
0,30	não houve	—
0,25	não houve	—

Para se determinar a quantidade de complemento que deve ser empregada de maneira a conter *duas unidades* cheias em

1 ml, de acordo com o exemplo dado, procede-se da seguinte maneira:

1 unid. exata = 0,4 ml compl. 1:30

1 unid. cheia = 0,45 ml compl. 1:30

2 unid. cheias = 0,90 ml compl. 1:30

30

— = 1,33

0,9

Assim, 1 parte do complemento mais 32 partes de tampão dará a diluição 1:33.

No teste propriamente dito não se recomenda empregar 2 unidades cheias de complemento em diluição inferior a 1:30 e nem superior a 1:43.

Nota — A substituição de duas unidades cheias de complemento por duas unidades exatas aumenta a sensibilidade da reação, porém, aumenta também a possibilidade de reações cruzadas. No entanto, achamos válida principalmente para os Serviços de Banco de Sangue.

Reação de Kolmer modificada

QUADRO IV

Tubo de reação ml	Tubos de controle				
	sêro ml	Antígeno ml	Sistema hemolítico ml	Glóbulos ml	
Solução tampão	0	0,25	0,1	0,35	0,85
Sêro do paciente	0,1	0,1	0	0	0
Antígeno	0,25	0	0,25	0	0
Encubar	Temperatura ambiente — 15 minutos				
Complemento (2 unidades cheias)	0,5	0,5	0,5	0,5	0
Encubar	Banho-maria 37°C — 90 minutos				
Hemolisina (5 unidades)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Glóbulos carneiro a 2%	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Encubar	Banho-maria 37°C — 30 minutos e leitura				

O sôro contrôle deve apresentar hemólise completa dos glóbulos de carneiro.

Os resultados da reação pròpriamente dita poderão ser fornecidos pela quantidade de complemento fixado:

Nenhuma hemólise	=	reagente
25% de hemólise	=	reagente
50% de hemólise	=	reagente
75% de hemólise	=	reagente
95% de hemólise	=	fracamente reagente
100% de hemólise	=	não reagente

Observações

1. O tubo de contrôle do sôro deverá apresentar hemólise total. O tubo contrôle do antígeno deverá apresentar hemólise total. O tubo contrôle do sistema hemolítico deverá apresentar hemólise total. O tubo contrôle dos glóbulos de carneiro *não* deverá apresentar qualquer hemólise.
2. As reações positivas podem ser tituladas pela diluição do sôro a 1/2 — 1/8 — 1/16 — 1/32 etc. O resultado será fornecido: sôro reagente a 1/4 ou 1/32 etc.

RESUMO

Os autores apresentam uma reação de fixação de complemento com 100% de hemólise para o sistema Chagas, empregando, como antígeno, o antígeno metílico preparado segundo Baracchini *et alii*, 1966.

O principal objetivo dos autores dêste trabalho é possibilitar a qualquer laborató-

rio de sorologia trabalhar em doença de Chagas com uma técnica sorológica simples e segura.

A referida técnica é a que vem sendo empregada nos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz, onde vários estudos comparativos já foram realizados, tanto com outras técnicas, como a de Freitas e Almeida, 1949, como com reações de imunofluorescência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J. O. — Interpretation de los titulos de las reaciones quantitativas de la fijacion del complemento en el sistema enfermedad de Chagas. Bolm. Chil. Parasit. 24(1-2):77-83, 1969.
2. ALMEIDA, J. O.; PRATA, A.; ARJONA, A. C. & ARANTES, J. B. — Presença de inibidor específico de fixação de complemento em antígenos preparados de *Trypanosoma cruzi*. Bolm. Of. Sanit. Pan-am. 66(4):304-14, 1969.
3. BARACCHINI, O.; COSTA, A. & CARLONI, J. — Emprêgo do calor à temperatura de 120°C e do metanol no preparo do antígeno de *Trypanosoma cruzi*. Hospital, Rio de J. 70(1):97-100, 1966.
4. BATISTA, M. S. & SANTOS, U. M. — Antígeno metílico de *Schizotrypanum cruzi*. Hospital, Rio de J. 56:1045-51, 1959.
5. FREITAS, J. L. & ALMEIDA, J. O. — Nova técnica de fixação de complemento para moléstia de Chagas (Reação quantitativa com antígeno gelificado de culturas *Trypanosoma cruzi*. Hospital, Rio de J. 35:787-800, 1949.
6. KOLMER, J. A.; SPAULDING, E. H. & ROBSON, H. W. — Approved laboratory technic. 5. ed. New York, Appleton, 1951.

Recebido para publicação em 12 de maio de 1970

MANUTENÇÃO DE ESPOROS DE *PENICILLIUM NOTATUM* POR LIOFILIZAÇÃO (OBSERVAÇÃO DURANTE 25 ANOS) ⁽¹⁾

MAINTENANCE OF SPORES OF *PENICILLIUM NOTATUM* BY LYOPHILIZATION (OBSERVATION DURING 25 YEARS)

HASSIB ASHCAR ⁽²⁾

SUMMARY

The author analyses the morphological and biochemical characteristics of *Penicillium notatum* obtained from lyophilized spores maintained in a common refrigerator during 25 years. All the characteristics were the same, before and after lyophilization, including the capacity of producing penicillin. Lyophilization is recommended to preserve active inoculum for both production of penicillin and maintenance of type species of *Penicillium notatum*.

INTRODUÇÃO

Com o advento da penicilino-terapia, graças aos trabalhos iniciais de CHAIN *et alii*¹ e de ABRAHAM *et alii*¹, surgiram numerosos problemas de ordem técnica para a produção de penicilina, em larga escala por biossíntese, destacando-se, entre eles, o da manutenção de amostras de *Penicillium* com elevada capacidade penicilinógena.

Como ocorre com numerosos fungos, as culturas de *Penicillium notatum*, após repiques freqüentes, em meios artificiais de cultura, tendem facilmente a se degenerar, a ponto de perder parcial ou totalmente a capacidade de produzir penicilina. Era evidente a necessidade de se procurar um método seguro para a manutenção de culturas ativas.

No decurso de nossos estudos iniciais, em 1941, sobre a morfo-biologia do *Penicillium notatum*², observamos que o dessecação natural da cultura, em temperatura ambiente, não era processo seguro para a manutenção deste fungo; o mesmo ocorreu com esporos dessecados em estufa a 37°C³.

Nessa ocasião, FOSTER, WOODRUFF & MCDANIEL⁵ recomendavam, para a conservação do *P. notatum*, misturar esporos de cultura ativa com areia ou terra, em tubos, antes da secagem em baixa temperatura. Estes autores usavam esporos secos como material de semeadura para a produção de penicilina, por julgarem que, assim conservados, eles mantinham indefinidamente a capacidade de produzir esse antibiótico.

Tomando como base a secagem em baixa temperatura, começamos a usar, em 1945, o processo da liofilização para a manutenção de esporos de cultura de *Penicillium notatum*³.

No ano seguinte, THOM & RAPER⁷ fizeram referência a trabalho de Wickerham & Andreasen (1942) que haviam mantido, por um ano, leveduras liofilizadas.

Posteriormente, RAPER & THOM⁶ relataram estudos de Raper & Alexander (1945) que, utilizando culturas liofilizadas de *Penicillia*, observaram que elas conservavam

(1) Realizado no Instituto Adolfo Lutz (Secção de Micologia)
(2) Do Instituto Adolfo Lutz e do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

suas características morfológicas e culturais após cinco anos, parecendo ser preservadas também suas características bioquímicas. Verificaram, ainda, que as amostras produtoras de penicilina mantiveram esta capacidade inalterada por mais de dois anos.

Constitui o objetivo dêste trabalho o contrôle periódico, com intervalos longos de tempo, dos caracteres morfológicos e das propriedades bioquímicas, inclusive a de produzir penicilina, de culturas de *P. notatum*, obtidas a partir de esporos liofilizados, a fim de avaliar o método de liofilização para a manutenção dêste fungo.

MATERIAL E MÉTODOS

Penicillium notatum

A cultura por nós utilizada foi enviada, em 1941, ao Instituto Adolfo Lutz pelo Dr. Charles Thom, do "United States Department of Agriculture", com a indicação 144-5767 do microrganismo de Fleming.

Método de liofilização

Para a liofilização, usamos, em sôro normal de cavalo, suspensões de esporos de cultura ativa de *P. notatum*. A técnica adotada foi a seguinte: distribuímos estêrilmente, em tubos (12x12mm), 0,5 ml de sôro normal de cavalo. A cada tubo transferimos uma alça de platina carregada de esporos de cultura de sete dias de *P. notatum*, desenvolvida em tubo inclinado de agar Sabouraud glicosado. As suspensões de esporos foram imediatamente congeladas, por refrigeração a -40°C, obtida com mistura de neve carbônica e álcool etílico e, em seguida, secadas a vácuo. Após a secagem, os tubos foram fechados a chama de bico de Bünsen e mantidos em refrigerador comum a $\pm 4^\circ\text{C}$.

Contrôle morfo-biológico

Feito em culturas de *P. notatum* obtidas a partir de esporos liofilizados, consistiu na observação dos seguintes caracteres e propriedades:

1. *Caracteres macroscópicos* — Aspecto, forma, tamanho, cor e produção de pigmento de colônia gigante, desenvolvida em meio

sólido de Czapek-Dox modificado³, após incubação a 25°C durante sete dias.

2. *Caracteres microscópicos* — Micélio vegetativo, apresentando hifas septadas com ramificações laterais e anastomoses (fusão de micélio). Com relação ao aparelho reprodutor, verificação da presença de conidióforos, dando origem sucessivamente, no sentido próximo-distal, a ramos, métulas e esteríngmas, de onde se originam os esporos exógenos (conídios).

3. Propriedades bioquímicas

a) Testes de capacidade de produzir ácido, a partir de dextrose, sacarose, maltose e glicerol, no meio semi-sólido de Hiss. Incubação a 25°C e leituras diárias do segundo ao sétimo dia.

b) Prova de capacidade de produzir penicilina, no meio líquido de Czapek-Dox modificado, com altura de 2 cm em frasco de Fernbach. O inóculo consistiu em rica suspensão de esporos de *P. notatum*, obtida de cultivo de sete dias em tubo inclinado de agar Sabouraud glicosado. Incubação do frasco a 25°C. Pesquisa de produção de penicilina, na ocasião em que o meio atinge pH neutro, após a forte acidificação que ocorre nos primeiros dias de cultivo. Titulação pelo método das diluições seriadas em tubos, usando como germe de prova a conhecida amostra padrão de *Staphylococcus aureus* 209 P.

RESULTADOS

Os exames de contrôle dos caracteres macro e microscópicos e das propriedades bioquímicas das culturas de *P. notatum*, obtidas a partir de esporos liofilizados, foram feitas em três ocasiões diferentes: na primeira, 10 anos após a liofilização dos esporos, tendo sido apresentados os resultados, a convite do Prof. Dr. Carlos da Silva Lacaz, na reunião de 23 de maio de 1959 do Simpósio sobre Micologia, da Sociedade de Biologia de São Paulo; na segunda (1962), 17 anos após a liofilização, relatamos os nossos achados em reunião da Sociedade de Microbiologia, de Ribeirão Preto, presidida pelo Prof. Dr. José Oliveira de Almeida. Nessas duas ocasiões, os resultados obtidos, inclu-

sive com relação à capacidade de produzir penicilina, foram iguais aos que havíamos observado antes da liofilização² e³. Finalmente, os resultados obtidos 25 anos após a liofilização, serão descritos, a seguir.

Exame macroscópico colônia discóide com 2 a 3 cm de diâmetro. Na face superior, de aspecto penujento, distinguem-se três zonas concêntricas; a central, de cor verde-escuro, abrangendo a maior parte da colônia, é saliente, pregueada, com sulcos dispostos como raios de circunferência, com filamentos aéreos longos e gotículas amarelas que não molham a colônia; a zona intermediária, de cor branco-esverdeada, com filamentos aéreos curtos e, finalmente, a zona periférica, com aspecto de franja, formada por delicados filamentos, de 2 a 3 mm de comprimento, aderentes ao meio. Face inferior da colônia, com aspecto de membrana, ondulada e de cor branco-amarelada.

A colônia produz pigmento amarelo que se difunde no meio de cultura.

Exame microscópico: Micélio vegetativo constituído por trama de hifas septadas que emitem ramificações laterais, com freqüentes anastomoses (fusão de micélio). A formação de esporos exógenos (conídios) se realiza através de aparelhos conidianos com forma de pincel ("penicillus"), constituídos por conidióforos que se dividem em ramos; êsses, por sua vez, em métulas sustentando esterígmas que dão origem aos esporos.

Provas bioquímicas: Provas da capacidade de produzir ácido, a partir de dextrose, sacarose, maltose e glicerol positivas, em leituras do segundo ao quarto dia de incubação. No quinto, viragem do indicador para a alcalinidade nos tubos de dextrose, sacarose e maltose, continuando acidificado somente o glicerol.

Prova de capacidade de produzir penicilina, pelo método das diluições seriadas em tubos: inibição total do crescimento do *Staphylococcus aureus* 209 P até a diluição de 1:40, e inibição parcial, até a diluição de 1:80.

DISCUSSÃO

Comparando-se os resultados, publicados anteriormente³, dos exames macroscópico e microscópico das culturas de *Penicillium notatum* com os observados neste trabalho, de culturas obtidas a partir de esporos liofilizados há 25 anos, verifica-se que êles são iguais. Não houve variação dos caracteres da colônia gigante, quanto ao crescimento, aspecto, forma, tamanho, cor e produção de pigmento, nem das estruturas microscópicas (micélio vegetativo e aparelhos conidianos).

A análise comparativa das atividades das culturas desse fungo, antes e após a liofilização, sobre a dextrose, sacarose, maltose e glicerol mostra igualdade de resultados, inclusive com relação às modificações do pH do meio.

Analisando-se os resultados das provas de produção de penicilina, pelo método das diluições seriadas em tubos, verifica-se que a cultura de *P. notatum*, após a liofilização, mantinha-se ativa, com título de inibição total de 1:40, superior ao de 1:20 obtido com a cultura antes da liofilização. Esta desigualdade de títulos pode ser explicada por diferença de sensibilidade dos germes de prova, considerando que, em nosso trabalho anterior², foi usada cepa diferente de *Staphylococcus aureus*.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, podemos concluir que:

1. A liofilização é método seguro de manutenção de esporos de *Penicillium notatum*, conservando a capacidade de desenvolvimento de culturas com todos os seus caracteres morfológicos.
2. A liofilização é método recomendável para a manutenção de inóculo ativo para a produção de penicilina e para a conservação da espécie tipo *Penicillium notatum*.

RESUMO

Foram analisados os caracteres morfológicos das culturas de *Penicillium notatum*, obtidas a partir de esporos liofilizados e mantidos durante 25 anos em refrigerador comum. Comparando-se êstas observações com as encontradas antes da liofilização, verificou-se igualdade de resultados, inclusive com relação à capacidade de produzir penicilina. O autor considera a liofilização método recomendável para a conservação de inóculo ativo para a produção de penicilina e para a manutenção da espécie tipo de *Penicillium notatum*.

Agradecimentos — Aos Srs. Luiz Paulo Faraco e Januário José Delle Cave, pela valiosa colaboração na parte técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E.; FLETCHER, C. M.; GARDNER, A. D.; HEATLEY, N. G.; JENNINGS, M. A. — Further observations on penicillin, *Lancet* 2:177-88, ago., 1941.
2. ASHCAR, H. — Contribuição ao estudo morfológico do *Penicillium notatum*. Rev. Inst. Adolfo Lutz 2:309-25, 1942.
3. ASHCAR, H. — Penicilina. Estudo geral e aplicação em terapêutica. Rev. Inst. Adolfo Lutz 5(1):31-262, 1945.
4. CHAIN, E.; FLOREY, H. W.; GARDNER, A. D.; HEATLEY, N. G.; JENNINGS, M. A.; ORR-EWING, J.; SANDERS, A. G. — Penicillin as chemotherapeutic agent, *Lancet* 2:226-8, 1940.
5. FOSTER, J. W.; WOODRUFF, H. B. & McDANIEL, L. E. — Microbiological aspects of Penicillin. III. Production of Penicillin in surface cultures of *Penicillium notatum*. *J. Bact.* 46(5):421-33, 1943.
6. RAPER, K. B. & THOM, C. — A manual of the Penicillia. Baltimore. Williams & Wilkins, 1949, p. 79-80.
7. THOM, C. & RAPER, K. B. — A manual of the *Aspergilli*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1945. p. 53.

Recebido para publicação em 20 de julho de 1970.

CONSERVAÇÃO DO LEITE "IN NATURA" POR MEIOS FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO COMO CONSERVADOR ⁽¹⁾

MILK "IN NATURA" PRESERVATION BY PHYSICAL, CHEMICAL AND BIOCHEMICAL METHODS. HYDROGEN PEROXIDE USED AS AN PRESERVATIVE

ALEXANDRE MELLO FILHO ⁽²⁾
LUIZ CELSO DE CASTRO ⁽³⁾

SUMMARY

According to Brazilian Federal Regulation in this field, milk "in natura" can only be preserved through physical methods such as filtration, refrigeration and pasteurization. The usage of any other preservative — biochemical and chemical methods — is an evident transgression to the Regulation, and its lasting presence and easy detection, even in small quantities, makes the usage of these substance for illegal means, an impossibility. Although it is accepted the lasting presence of the hydrogen peroxide in decreasing doses in milk, it is also accepted that 5 hours after it is added, is no method known to check its presence in raw milk. This fact makes its usage desirable.

In 1966 and 1967 the authors published two papers on bacterial inhibitors present in milk of São Paulo, Brazil, and the result of the researches they performed denounced the presence of inhibitors, most of them non identified, in 15-20% of the samples, in 1966, and in 9% of the samples, in 1967. The same authors performed the present work in order to emphasize the importance of a method, even indirect one, good enough to detect the presence of hydrogen peroxide, beyond the period of 6 hours, as long as its inhibitors action is working on bacterial flora. This method is based upon an association of well known methods, and particularly the use of C.T.T. redutase test and agar-plate assay of *Bacillus subtilis* A.T.C.C., 6633 and *Sarcina lutea* A.T.C.C., 9341.

Experimentally, it was possible to check the presumptive presence of hydrogen peroxide, through its inhibitor action, 24 hours or more after it had been added it to standard raw milk. This method was later used in examining samples of milk grades B e C consumed in São Paulo, Brazil.

INTRODUÇÃO

Sob o ponto de vista físico-químico, é o leite uma emulsão de gordura em solução aquosa, contendo numerosas substâncias na forma coloidal ou dissolvidas.

Dos seus principais componentes, dissolvidos (albuminas, lactose, sais minerais, gases, vitaminas) ou na forma coloidal (ca-

seína, entre outros), dos corpos de origem proteínóide com função específica (aglutinases, imunoglobulinas, complemento, anticorpos, diástases), dos hormônios, da água que contém e das substâncias gordurosas decorrem suas propriedades físico-químicas, dietéticas e biológicas ^{1, 2, 3}.

(1) Trabalho realizado na Divisão de Contrôlo de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo.

Apresentado, como Tema Livre, no II Congresso Brasileiro de Microbiologia, realizado no Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo, em 29 de agosto de 1970. Cidade Universitária, São Paulo, Brasil.

(2) Da Divisão de Contrôlo de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios. Da Clínica Dermatológico-sifilográfica do Hospital Municipal de São Paulo, Do Departamento de Dermatologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

(3) Da Divisão de Contrôlo de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo.

Mas o leite de consumo, mesmo quando obtido de animais sadios e em rigorosas condições técnicas, já contém ao ser ordenhado, um apreciável teor bacteriano, carregado dos canais galactóforos, ao qual se acrescenta a flora de contaminação do meio exterior. É a flora banal do leite que atua apenas sobre a qualidade do produto, a sua conservação, o seu organoleptismo, podendo haver a interferência dos patogênicos, geralmente de origem bovina, com mais graves conseqüências para a saúde pública, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11.

Nas regiões de clima quente, há necessidade da estrita observância das condições que impeçam ou dificultem a proliferação daqueles microrganismos no leite, envolvendo o local da ordenha, a saúde do gado e do homem que o ordenha, a qualidade dos recipientes coletores do leite, a rapidez da remoção do produto do estabulo, seu resfriamento, seu transporte para as cidades.

Conforme enfatiza VILARES³⁵, a coexistência desses fatores implica em certo padrão de riqueza e de civilização no meio rural.

Os processos atualmente empregados nos países mais evoluídos, na conservação do leite "in natura", baseiam-se exclusivamente no emprêgo de meios físicos: filtração e clarificação, refrigeração e aquecimento.

O frio, pela inibição que produz no desenvolvimento da flora microbiana, com a vantagem da não alteração do valor nutritivo do leite, é incapaz de destruir os germes patogênicos, passando pois à categoria de processo auxiliar, antecedendo e sucedendo a outra forma mais eficaz de beneficiamento, e principalmente utilizado no transporte do leite do interior às cidades.

O emprêgo do calor para o pré-aquecimento é processo somente utilizado no Brasil; antecede a pasteurização e é realizado em aparelho com contrôle automático de temperatura, tempo e volume do leite e jamais poderá ser pretexto para a conser-

vação, pela redução parcial da flora microbiana excessiva, de leites de má qualidade.

O emprêgo do calor na pasteurização do leite vem sendo realizado pelo método rápido que emprega aparelhos em placas em função da combinação do tempo e da temperatura no aquecimento do leite em camadas laminares, obtendo-se total eliminação dos germes patogênicos, e considerável redução na flora global.

O efeito fundamental da pasteurização, como técnica industrial, incluída no domínio dos preceitos bromatológicos é, não só a profilaxia das contaminações humanas, como também transmissão ao produto da durabilidade necessária à distribuição e ao consumo.

Mas, para despoluir o leite das suas impurezas mais grosseiras, antes do tratamento calórico, já se impõe, desde a fonte de produção, a filtração do produto que, nos estábulos é feita com a utilização de telas milimetradas mas, muitas vezes, negligenciada ou feita através da utilização de panos rusticos, no transbôrdio do leite dos baldes para os latões e nos centros de recepção e resfriamento para onde convergem aqueles leites, inicialmente pela passagem através de telas metálicas e, após, por filtração em apropriados filtros de flanela ou, então clarificado por centrifugação.

Mas já nos entrepostos muitas vezes se patenteiam, mesmo na operação chamada de telagem, os precários cuidados com que foi o leite obtido, pelo encontro dos mais variados detritos — artrópodes, restos vegetais, pêlos animais, naturalmente em grau maior ou menor de acôrdo com a zona produtora.

Outros meios físicos empregados limitadamente são utilizados pela radiação ionizante, luz ultra-violeta, raios X, raios catódicos, neutrons, raios gama e pelos ultrassom, pressão ou eletricidade⁹.

A radioatividade, o método do futuro, esbarra ainda com uma série de problemas de ordem técnica, na conservação do leite "in natura", embora já esteja sendo empregada no Canadá, E.U.A. e Rússia, na

conservação de alimentos; e nos E.U.A., com a autorização do "Food and Drugs Administration", para a esterilização do toucinho defumado, desinfestação do trigo e inibição do brotamento das batatinhas, pelo emprêgo do Cobalto 60³³.

Mas, para o destino à pasteurização, deve o leite cru ser obrigatoriamente selecionado desde a área de produção, seleção esta realizada pela inspeção higiênico-sanitária oficial, patenteando-se que certos leites crus não têm condição mínima para o envio ao beneficiamento, dada a sua poluição, acidez, composição química em geral e propriedades organolépticas anormais.

Porém, ainda mais grave é o problema do adicionamento ao leite de conservadores antissépticos, o que implica na dissimulação, com má fé, da falta de cuidados higiênicos, na produção.

Então, por definição abreviada, segundo o nosso Regulamento Federal,^{5, 6} e o "Comité mixte d'experts de l'hygiene du lait", 1957¹⁰, leite cru é aquele que foi submetido em seleção prévia, às operações conservadoras de filtração e clarificação, refrigeração, às quais *no Brasil* se acrescenta a do pré-aquecimento, *sendo proibido, pois, o emprêgo de substâncias químicas na conservação do leite*, que não deverá também veicular qualquer elemento estranho a sua composição.

O processo combinado da conservação, pela filtração e clarificação, resfriamento e congelamento parcial, pré-aquecimento e pasteurização exige gastos de instalação e elevado custo de manutenção e operação.

Há longos anos a técnica industrial vem estudando a possibilidade da obtenção do meio conservante ideal, capaz, pelo seu emprêgo, de suprimir aquelas onerosas e especializadas operações. Entretanto, a maioria dos conservadores químicos e bioquímicos têm-se mostrado tóxica para o consumidor, ou sensibilizante, de ação conservante limitada, alterando o organoloptismo e a composição do leite ou interferindo na industrialização dos seus subprodutos fermentados e, o que é absolutamen-

te grave, não destruindo as toxinas bacterianas termo-lábeis e certos tipos de microrganismos patogênicos^{9, 20, 21, 22, 26, 28, 35}.

Os conservantes no leite se distribuem em duas categorias principais: os que agem como neutralizantes ou como antissépticos. Os neutralizantes atuam sobre um fato consumado, a presença do ácido láctico derivado da bio-atividade das bactérias sobre a lactose. Não reduzem a flora microbiana, mas apenas evitam a coagulação do leite e, entre estes, principalmente se colocam o bicarbonato de sódio, o hidróxido de sódio e o carbonato de cálcio. Os conservantes antissépticos mostram relativo grau de toxidez e modificam profundamente as propriedades do leite ou podem ser pouco alterantes e não tóxicos. Entre os antissépticos os mais conhecidos são o aldeído fórmico e o cloro.

O aldeído fórmico, na concentração de 1/1 000 ou 1/2 000, produz, durante as primeiras 24 horas, um rápido decréscimo da flora bacteriana; após, uma lenta mas constante diminuição, até que, no fim de 5 dias, o leite estará praticamente estéril, agindo, pois, como uma verdadeira autoclave química; na proporção de 1/20 000, conserva o leite duas ou três vezes mais do que o mesmo sem tratamento algum, mas, na concentração de 1/5 000 ou 1/10 000, é o aldeído fórmico realmente um bom conservante se não fôra pela insolubilização da caseína, o que vai prejudicar a digestibilidade do produto.

Quanto ao cloro, tão amplamente utilizado no saneamento da água de consumo das cidades, no leite o seu índice de aproveitamento mostrou ser muito baixo, dadas as grandes alterações que produz no gosto e aroma do produto, mesmo em 50 e 100 p.p.m., quando se sabe que em concentrações menores a sua ação bacteriana no leite é bem pequena^{8, 9, 10}.

Como conservantes antissépticos não tóxicos, temos os antibióticos e classicamente, os compostos de amônio quaternário e o peróxido de hidrogênio.

Os antibióticos, que são conservadores bioquímicos, além de interferirem intensa-

mente na industrialização do leite, na produção de derivados fermentados, e da sua inocuidade para a maioria dos germes patogênicos do produto, podem produzir fenômenos de sensibilização em pessoas, quando altamente sensibilizadas²².

Os compostos de amônio quaternário em concentração adequada, são atóxicos, não irritantes, estáveis ao tratamento térmico e relativamente estáveis na presença de matéria orgânica, tendo boa atividade em qualquer pH., não imprimindo ao leite gosto ou aroma indesejáveis^{10, 13}.

Nos Estados Unidos, o aparecimento constante do amônio quaternário no leite de consumo originou vultuosa literatura, sendo considerado como resultante do tratamento químico, na higienização em laticínios^{10, 13}.

No Brasil, em laticínios, o amônio quaternário não é empregado como agente de higienização de aparelhagens e utensílios, sendo utilizado, entre outros, o cloro, liberado de solução de hipoclorito de sódio.

Finalmente, o peróxido de hidrogênio, *amplamente conhecido em nosso país*, pela maioria dos produtores de leite, como conservante efetivo do produto e sob o nome de água oxigenada ou peridrol, foi empregado desde os fins do século passado por Budde, na Alemanha, no processo conhecido como Budderização do leite.

A redução microbiana obtida é de ordem de 50% ou mais, com ligeiro acrescentamento ao produto de um sabor metálico ou maltado e com o desaparecimento espontâneo do conservante, decomposto pelas diastases, com liberação de oxigênio nascente.

A inocuidade deste processo se patenteou nas observações realizadas na Itália na nutrição experimental de 37 lactentes com leite ao qual foi acrescentada água oxigenada obtida por meios eletrolíticos^{21, 22}.

Em 1948, na Checoslováquia, e em 1950, na França, pesquisadores recomendaram o seu uso. Mas dignas de referências são as experiências oficiais italianas, em 1941, presididas pelo Professor

Satta, Diretor do Instituto de Higiene da Universidade do Siena, que confirmaram as observações realizadas em Roma, Milão, Gênova, Turim, Nápoles, Bolonha e Florença e em outras cidades, e que culminaram com a autorização do emprêgo do referido antisséptico, desde que observadas algumas condições, tais como o uso de peróxido de hidrogênio obtido por meio eletrolítico, de 130 volumes, e aplicado no leite na quantidade de 1 a 2/1 000 e sempre 5 horas antes do envio ao consumidor⁸.

Conforme acentua CECILIA⁸, o emprêgo do peróxido de hidrogênio só será tolerado em regiões extremamente subdesenvolvidas e, mesmo assim, como elemento conservador para o transporte do leite, dada a falta da refrigeração, ou em épocas excepcionais, como durante as conflagrações mundiais.

De fato, o adicionamento do peróxido de hidrogênio não oferece a garantia da eliminação dos germes patogênicos, e repetidas investigações provaram que a sua adição ao leite produz perda de 10 a 20% da vitamina A, 50% da B, e a quase totalidade da vitamina C.

Embora o peróxido de hidrogênio continue presente no leite, em quantidades menores e decrescentes, após *cerca de 6 horas* da sua colocação, não há meio corrente conhecido para avaliar a sua presença. Constituindo tal fato um estímulo para a transgressão do que preceitua o Regulamento Federal, elaboramos este trabalho, no intuito de fornecer um processo capaz de determinar, embora indiretamente, a presença do peróxido de hidrogênio como antisséptico, além daquelas 5 horas, e enquanto durar o seu efeito inibidor microbiano.

MÉTODOS

MÉTODO DE DUPOY, MODIFICADO E DA OXIDAÇÃO DO IODETO

São os dois métodos clássicos de pesquisa do peróxido de hidrogênio. O de Dupoy modificado foi empregado pelo uso da solução alcoólica de guaiacol a 1%,

clássicamente¹¹. Pela interferência da peroxidase existente no leite cru ou pasteurizado, surgiu, ao adição do guaia-col, uma coloração vermelho-salmão. O segundo método da oxidação do iodeto foi realizado segundo as recomendações de PIEN, DESIRENT & LAFONTAINE²⁷; pelo acrescentamento do amido surgiu no leite uma nítida coloração azulado-violeta, quando da presença do peróxido de hidrogênio.

CONTAGEM GLOBAL MICROBIANA EM PLACAS E PELO MÉTODO DE BREED

As contagens foram realizadas segundo técnica preceituada pelo "Standard Methods"^{1, 2}. A contagem global em placas, contendo gelose-padrão, foi feita após 48 horas de incubação a 32°C. A contagem microbiana direta, pelo método de Breed, foi realizada quase que imediatamente com a utilização da coloração da lâmina contendo o leite, pelo azul de metileno.

ACIDIMETRIA, POTENCIOMETRIA, REDUTASE PELO AZUL DE METILENO E CONTAGEM DE COLIFORMES

A dosagem da acidez do leite foi realizada pelo processo de Dornic, a potenciometria através do emprêgo do potenciômetro. A redutase do azul de metileno e a contagem de coliformes, utilizando placas contendo "violet-red-bile-agar", foram realizadas segundo processos indicados pelo "Standard Methods" e pelo livro da MILK INDUSTRY FOUNDATION²³ — "Laboratory manual of analysis of milk and its products".

PESQUISA DE INIBIDORES EM GERAL COM O EMPRÊGO DAS PROVAS DO C.T.T., COAGULAÇÃO DO LEITE E DA PLACA AGAR-GERME DE PROVA

O emprêgo do C.T.T. que, em última análise, é também uma prova de redutase, foi feito de acôrdo com método por nós já descrito²⁰, após o aquecimento das amostras de leite a 80°C, 5 minutos, para a inativação dos inibidores naturais do leite,

semeadura de germes fermentadores da lactose — *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, e incubação a 37°C, 2 horas e meia, após adição do C.T.T. Com a multiplicação dos germes, surgiu no leite uma côr vermelha, a do C.T.T., reduzido. Na presença de inibidor do crescimento bacteriano, não se deu a multiplicação microbiana, e o C.T.T. permaneceu inalterado, na sua leucoforma. A prova da coagulação do leite foi realizada pelo mesmo princípio, mas sem o acrescentamento do C.T.T.

Na ausência de inibidores, o leite sob ação bacteriana se acidificou e coagulou; em caso contrário, permaneceu líquido. Tal acidez foi testada pelo processo de Dornic e pela potenciometria. O método da placa agar-germe de prova, contendo, pois, esporos de *B. subtilis* A.T.C.C. 6.633 ou *S. lutea* A.T.C.C. 9.431, pela colocação nessas placas das amostras dos leites problemáticos, embebedas em discos de papel de filtro, fez surgir halos de inibição do crescimento daqueles germes de prova, quando da incubação. Este último processo entretanto funciona muito bem para a presença de antibióticos e sulfamídicos, não acusando a presença do peróxido de hidrogênio e de alguns outros inibidores químicos^{20, 22}.

PESQUISA DA PENICILINA PELO EMPRÊGO DA PENICILINASE

O processo obedeceu, em linhas gerais, ao anteriormente citado. Entretanto, uma vez obtida a presença do halo de inibição, adicionamos à amostra de leite em causa a enzima penicilino-inativante específica — a penicilinase. O leite assim tratado não mais evidenciou a presença de inibidor bioquímico — a penicilina, comprovando especificamente a presença qualitativa e quantitativa do antibiótico^{20, 22}.

PESQUISA DA FOSFATASE PELO MÉTODO RÁPIDO DE SHARER

Foi realizada de acôrdo com o processo proposto por SHARER^{23, 31}.

MÉTODO PARA A OBTENÇÃO DA CATALASE

A catalase foi obtida pela sua extração do fígado fresco de bovinos, triturado, suspenso em água destilada, tratado pelo clorofórmio e álcool etílico; a pasta resultante, filtrada, ressuspensa, centrifugada, decantada, novamente suspensa em água destilada, refrigerada, 12 a 14 horas em repouso. Após esse período, a catalase surgiu cristalizada, na forma de agulhas, em suspensão²⁴. A atividade da catalase assim obtida foi a seguir testada com a Katalase 15674 EDKA BOEHRINGER, originária da República Federal Alemã^(*), na forma de suspensão cristalina — 100 mg/5 ml.

PROVAS SUBSIDIÁRIAS

As amostras do leite cru ou pasteurizado que demonstraram, pela prova da pesquisa de inibidores em geral, presença daquelas substâncias, foram sistematicamente examinadas pelo processo de Bratton-Marshall modificado²⁰ e de Miller-Elliker²⁰, para excluir respectivamente a presença de compostos sulfamídicos e de amônio quaternário. A possível presença dos demais conservantes de natureza química, principalmente o formaldeído, foi testada pelos processos preconizados pelos livros "Métodos Analíticos de Laboratório Lactológico y Microbiología de las Industrias Lácteas"³⁰ e "Métodos de análises bromatológicas"¹¹ do Instituto Adolfo Lutz.

RESULTADOS

Tendo ficado estabelecidos os métodos de exame, dividimos as pesquisas a serem realizadas em três etapas distintas:

1. Pesquisa do comportamento enzimático e da flora bacteriana do leite cru padrão, deixado durante 30 min. em temperatura ambiente, a seguir, examinado e após re-examinado, 5, 10 e 24 horas após ter ficado em ambiente, e sob refrigeração a 5 a 8°C.

2. Determinação em temperatura ambiente e sob refrigeração, pelos métodos clássicos de exame, da mais longa perma-

nência determinável do peróxido de hidrogênio acrescentado ao leite padrão (1/1000 ml), em estado de cru, fervido e pasteurizado.

3. Emprêgo do conjunto de métodos já relacionados e dos clássicos, nos exames de amostras do leite tipo "C" e "B" de consumo da Capital pasteurizado ou em estado de cru.

1. PESQUISA DO COMPORTAMENTO ENZIMÁTICO E DO DA FLORA BACTERIANA NO LEITE CRU, PADRÃO, ACRESCENTADO OU NÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E DA CATALASE.

A duas amostras do mesmo leite, acrescentamos peróxido de hidrogênio (30%, 120 vol., U.S.A. Baker), na razão de 1/1 000 ml; porém, em uma delas, 5 minutos após esta operação, adicionamos à Catalase 2 gotas/10 ml de leite. A seguir, realizamos em ambas as amostras as pesquisas relacionadas acima, nos mesmos ritmos horários já citados (2, 5, 10 e 24 horas), em temperatura ambiente e sob refrigeração.

Visamos também avaliar a capacidade do conjunto dos métodos já citados, na determinação da presença daquele inibidor, por nós experimentalmente adicionado ao leite, além das 5 primeiras horas da sua coloração, fazendo, portanto, confronto com os resultados obtidos pelos métodos clássicos correntes, empregados qualitativamente para os mesmos fins — o do guaicol e o da oxidação do iodeto.

A base para estabelecimento de paralelos foi fundamentalmente a comparação dos resultados obtidos com o leite cru, padrão, deixado 30 min, 5, 10 e 24 horas à temperatura ambiente e refrigerado, com as informações colhidas no exame do mesmo leite, em idênticas circunstâncias, mas com a adição de peróxido de hidrogênio e com o peróxido de hidrogênio e a catalase, conforme resultados relacionados no quadro I.

Conforme os resultados relacionados neste quadro, o leite padrão apresentou contagem global, em placas, de 25 000 000 colônias por mililitro e um valor bacterimétrico muito semelhante, 27 000 000, pela microscopia direta de Breed. A densidade coliformica em placas foi a de

(*) Gentilmente cedida pelo Prof. Klaus Zinner do Departamento de Bioquímica e Farmácia da U. S. P.

300 000 colônias por mililitro, o tempo da redutase do azul de metileno — 50 minutos, a acidez — 18°D, correspondente ao pH 6,58, potenciomêtricamente medido. A prova do C.T.T., pelo aparecimento de coloração róseo-avermelhada, negatividade da presença de inibidores, coagulação do leite mais "inoculum" de prova e ausência de inibição em placas com agar-germe excluíram a presença ativa de quaisquer inibidores do crescimento bacteriano (Fig. 1).

As provas que empregam o guaiacol em solução ou iodeto de potássio, obviamente não demonstraram presença do peróxido de hidrogênio. Em face dos resultados obtidos para o leite cru padrão, consideramos o mesmo isento de conservadores antissépticos, desenvolvendo-se a sua flora bacteriana global nas condições habituais.

Pelo exposto no quadro I, que apresenta também os resultados obtidos para o leite cru, adicionado recentemente do peróxido de hidrogênio — 30 minutos antes da prova — verificamos nêstes resultados as mesmas acentuadas alterações, perfeitamente notadas em comparação com os resultados obtidos para o mesmo leite, padrão. Realçamos a redução considerável da flora global computada pela contagem em placas, e a sua relativa não modificação quando avaliada pelo método de Breed, que consignou tôdas as bactérias — as recentemente desvitalizadas e as em atividade.

De fato, enquanto o método da semeadura em placas acusou a flora viva existente e já reduzida, o método de Breed computou tôdas as bactérias, desde que recentemente desvitalizadas, não levando em conta sequer o seu estado disgenético. A contagem global em placas foi a de 11 000 000 colônias/ml e a referida pelo método de Breed, 22 000 000 colônias/ml, dado êste muito próximo ao obtido para o leite padrão. Houve, em decorrência da diminuição da densidade da flora bacteriana em geral e da colifórmica, considerável aumento do tempo de redutase do azul de metileno que, de 50 minutos para o leite padrão, foi a 5 horas e 15 minutos para o acrescentado com o peróxido de hidrogênio. A prova do C.T.T. mostrou, pelo surgimento de uma côr róseo-clara, positi-

QUADRO I
Leite cru examinado após 30 minutos

Leite	Bacterimetria		Colimetria	Redutasi- metria	Acidez	Pesquisa de H ₂ O ₂		Pesquisa de inibidores em geral				
	Placas col./ml	Método Breed bactérias/ml				Placas col./ml	A. Metileno minutos	°D	Guaiacol	Iodeto	C.T.T.	Coagulação
Padrão	25 000 000	27 000 000	300 000	50	18	—	—	—	—	coagulado	—	—
Com H ₂ O ₂	11 000 000	22 000 000	13 000	315	18	+	+	+	+	líquido	—	—
Com H ₂ O ₂ e Catalase	20 000 000	23 000 000	180 000	110	18	—	—	—	—	coagulado	—	—

Negativo
Positivo
—
+

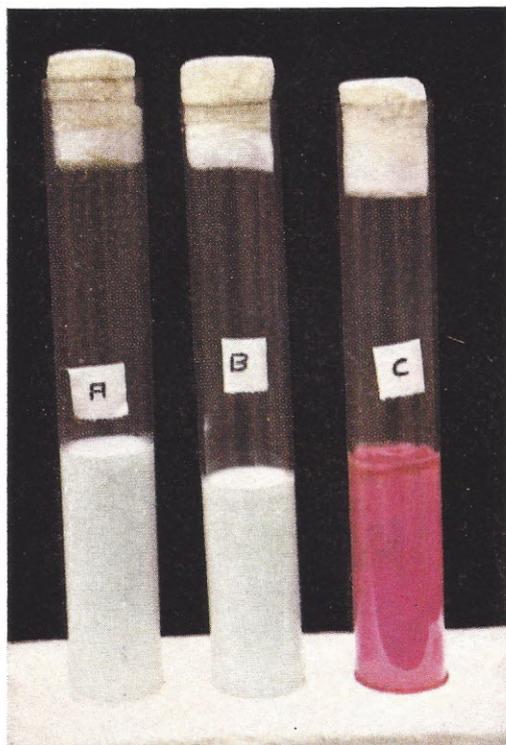


Fig. 1 — Leite cru, padrão.

Tubos A e B — cores brancas — provas de guaiacol e iodeto, negativas. Tubo C — cor vermelha — prova do C.T.T., negativa.

vidade para a presença do peróxido, o mesmo acontecendo com as demais provas, para tais fins (fig. 2). Apenas a prova que emprega a placa-agar-germe silenciou, não demonstrando inibição das suas bactérias, ao contrário do que acontece quando na presença de antibióticos ou sulfamídicos.

Nesse mesmo quadro I podemos apreciar que o leite cru acrescentado de peróxido de hidrogênio e, após, de catalase, mostrou comportamento intermediário, demonstrando com isso a ação apenas inicial do peróxido de hidrogênio, logo desdobrado em oxigênio molecular e água e inativado como antisséptico, pela ação enzimática da catalase. A sua flora bacteriana de índice intermediário entre a do leite padrão e a do leite adicionado somente ao peróxido de hidrogênio; a sua redutasiometria feita no tempo de 110 minutos, em contraposição aos 50 minutos, e 315 minutos (5 horas e 15 minutos) dos demais, mostraram o efeito

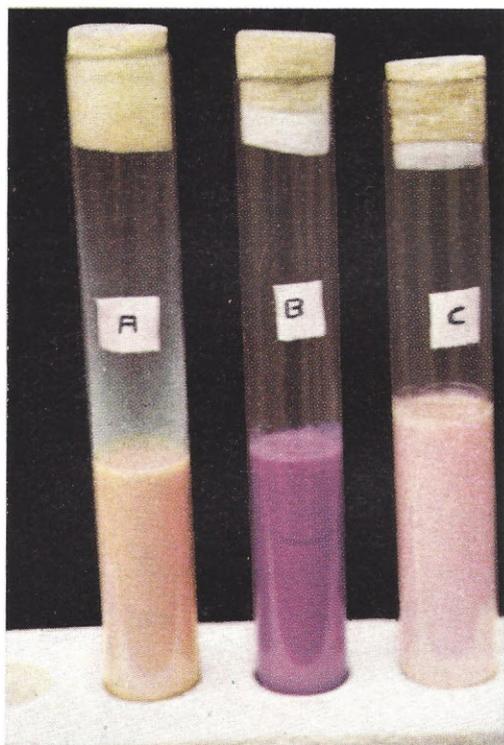


Fig. 2 — Leite cru, mais o peróxido de hidrogênio, recentemente colocado.

Tubos A, B e C — cores róseo-salmão, roxo-violeta e róseo-clara — provas do guaiacol, iodeto e C.T.T., positivas.

nítido daquela ação bactericida inicial. As provas da pesquisa de substâncias inibidoras não acusaram o peróxido de hidrogênio já desdobrado, o mesmo acontecendo com o método que utiliza o guaiacol e o iodeto. E como esse leite, nas provas subsequentes, após 5, 10 e 24 horas passadas, prosseguiu mostrando ausência do conservador e tendo um comportamento parecido com o do leite padrão, com a diferença somente devida à parcela de flora inicialmente reduzida, não mais computamos os seus resultados, pois o mesmo passou a funcionar como um leite, também padrão, mas com flora microbiana menor.

Cinco horas passadas do exame dos leites-testes, as amostras dos mesmos, conservadas refrigeradas, e em ambiente, foram re-examinadas, para estudo do seu comportamento.

Os dados obtidos estão demonstrados comparativamente nos quadros II e III:

QUADRO II

Leite cru padrão examinado após 5 horas

Leite	Bacterimetria		Colimetria	Redutasi- metria	Acidez	Pesquisa de H ₂ O ₂		Pesquisa de inibidores em geral		
	Placas col./ml	Método Breed bactérias/ml				Placas col./ml	A. Metileno minutos	°D	Guaiacol	Iodeto
cru										
Frigorificado	31 000 000	36 000 000	700 000	15	20	—	—	—	coagulado	—
Em ambiente	45 000 000	53 000 000	2 800 000	3	28	—	—	—	coagulado	—

QUADRO III

Leite cru, com H₂O₂, examinado após 5 horas

Leite	Bacterimetria		Colimetria	Redutasi- metria	Acidez	Pesquisa de H ₂ O ₂		Pesquisa de inibidores em geral		
	Placas col./ml	Método Breed bactérias/ml				Placas col./ml	A. Metileno minutos	°D	Guaiacol	Iodeto
cru										
Frigorificado	19 000 000	36 000 000	27 000	210	18	—	+	+	Líquido	—
Em ambiente	21 000 000	42.000 000	85 000	120	21	+	+	+	Líquido	—

MELLO FILHO, A. & CASTRO, L. C. — Conservação do leite "in natura" por meios físicos, químicos e bioquímicos. Peróxido de hidrogênio como conservador. Rev. Inst. Adolfo Lutz 29/30: 85-103, 1969/70.

Mesmo não entrando em detalhes, podemos ver entretanto que a flora do leite padrão, quer em ambiente ou refrigerada, aumentou consideravelmente, o mesmo acontecendo com o seu grau de acidez que, de 18°D, passou respectivamente a 20 e 28°D, enquanto que, no leite quimicamente conservado, mostrou o de 18 a 21°D, e flora consideravelmente mais baixa. A presença ativa do peróxido foi demonstrada pelo emprêgo do guaiacol, iodeto, C.T.T. e coagulação de prova. Noção já conhecida, mas digna de nota, foi a somação do efeito conservador dos dois conservantes, isto é, ação do peróxido aliada à frigorificação. E note-se que a frigorificação é norma rotineira, de exigência regulamentar, no transporte e estocagem do leite.

Dez horas passadas, foram mantidas as diferenças para o leite padrão conservado em ambiente e refrigerado, e acentuadas,

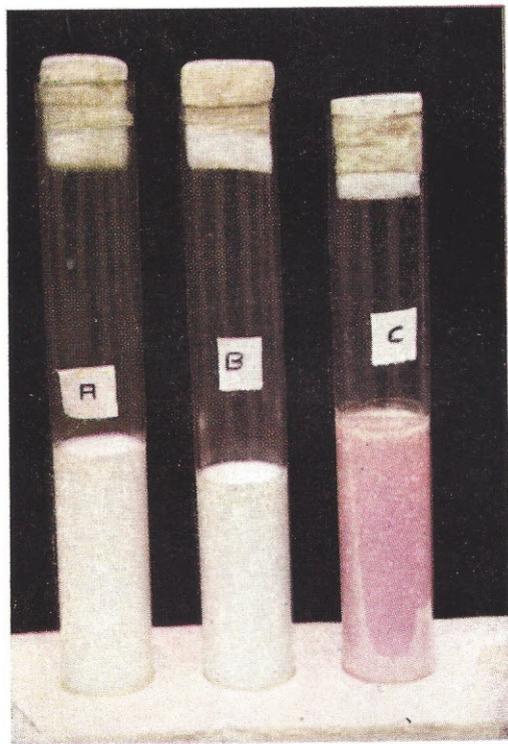


Fig. 3 — Leite cru, mais o peróxido de hidrogênio colocado há cerca de 10 horas.

Tubos A e B — cores brancas — provas de guaiacol e iodeto, negativas. Tubo C — cor róseo-clara — prova do C.T.T., positiva.

na sua réplica, com o peróxido de hidrogênio (quadros IV e V, pág. seguinte).

Os dados obtidos mantêm as mesmas diferenças, com uma exceção, exceção esta que é a base dêste trabalho. Enquanto os processos clássicos não mais acusam a presença do peróxido de hidrogênio, os métodos da presença de substâncias inibidoras indicam nitidamente a sua presença, pelo C.T.T. — positiva, roseo-claro — e a incoagulabilidade do leite mais o *inoculum* dos germes fermentadores da lactose. (Fig. 3).

Quanto aos demais valores, deixaremos de tecer comentários a respeito, pois poderão ser avaliados, inclusive por comparação, entre os diversos quadros apresentados e, daí, retiradas as múltiplas implicações.

Após 24 horas do início das pesquisas o leite padrão conservado em ambiente sofreu coagulação e ficou portanto sem condições de exame, sendo apenas consignada a sua acidez (55°D). Tal fato pode ser observado no quadro VI. Os valores obtidos para o mesmo leite frigorificado aí também estão.

Entretanto conforme dados do quadro VII, o leite que foi adicionado com o peróxido de hidrogênio, 24 horas passadas, mesmo deixado em temperatura ambiente, ainda tem condições de exame e qualidade muito melhor do que a apresentada pelo leite padrão, mesmo quando conservado sob refrigeração, a 8°C.

Note-se, e isto é fundamental, que enquanto prossegue o silêncio conivente das provas clássicas, na rotina da pesquisa do peróxido de hidrogênio, as provas do C.T.T. e coagulação acusam ainda a presença, decrescente mas ativa, daquele conservador.

QUADRO IV

Leite cru Padrão examinado após 10 horas

Leite cru	Bacterimetria		Colimetria Placas col./ml	Redutasi- metria A. Metileno minutos	Acidez °D	Pesquisa de H ₂ O ₂		Pesquisa de inibidores em geral		
	Placas col./ml	Método Breed bactérias/ml				Guaiacol	Iodeto	C.T.T.	Coagulação	Inibição Placas
Frigorificado	55 000 000	75 000 000	1 300 000	10	23	—	—	—	coagulação	—
Em ambiente	75 000 000	83 000 000	5 100 000	1	31	—	—	—	coagulação	—

QUADRO V

Leite cru com H₂O₂, examinado após 10 horas

Leite cru	Bacterimetria		Colimetria Placas col./ml	Redutasi- metria A. Metileno minutos	Acidez °D	Pesquisa de H ₂ O ₂		Pesquisa de inibidores em geral		
	Placas col./ml	Método Breed bactérias/ml				Guaiacol	Iodeto	C.T.T.	Coagulação	Inibição Placas
Frigorificado	22 000 000	48 000 000	35 000	160	20	—	—	+	Líquido	—
Em ambiente	42 000 000	61 000 000	340 000	60	26	—	—	+	Líquido	—

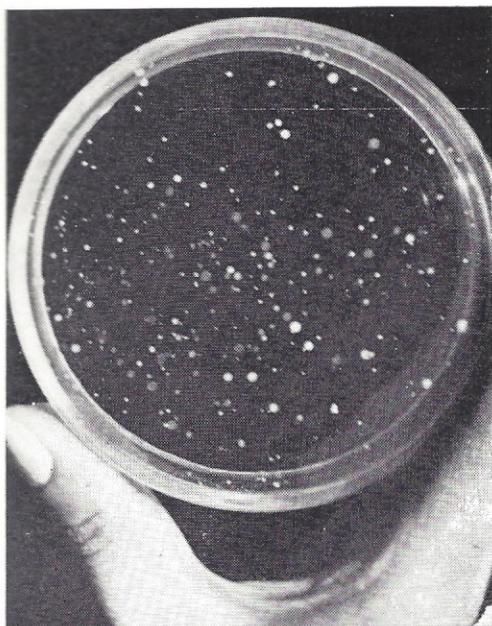


Fig. 4 — Placa com gelose, padrão, semeada com leite padrão, isento de inibidor (diluição 1/1 000 000)

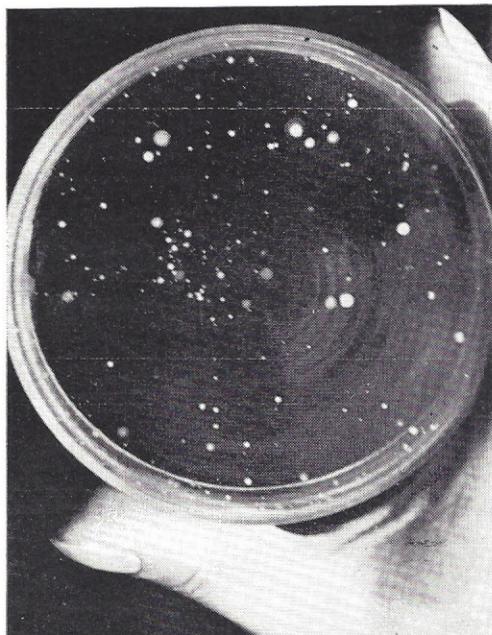


Fig. 5 — Placa com gelose, padrão, semeada com leite cru ao qual se acrescentou peróxido de hidrogênio a 1/1 000 (diluição 1/1 000 000).

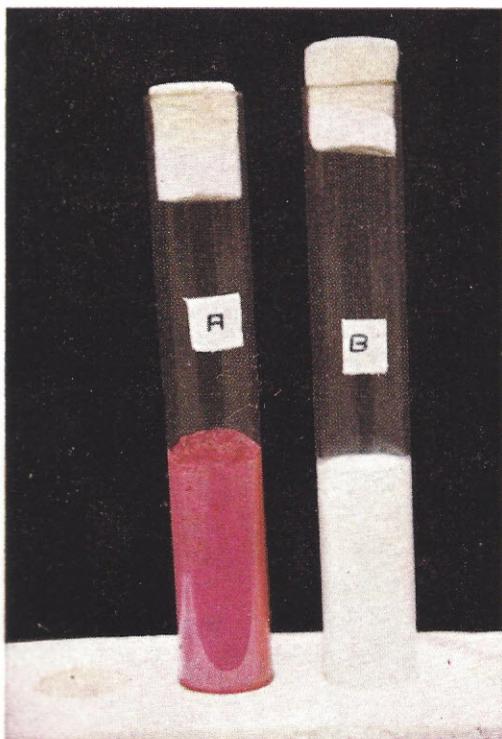


Fig. 6 — Leite cru, padrão.
Tubo A — cor vermelha — C.T.T. negativa para a presença de inibidores. Tubo B — cor branca — Azul de metileno já reduzido pela flora bacteriana. Relacionar com a fig. 4.

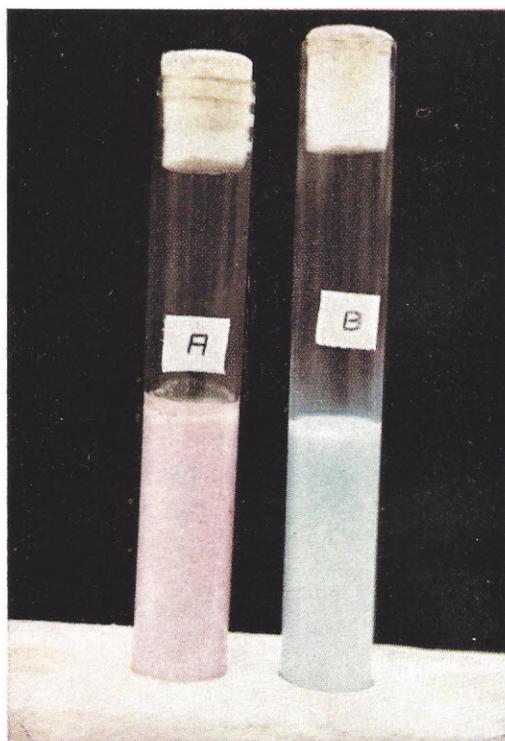


Fig. 7 — Leite cru ao qual se adicionou peróxido de hidrogênio.
Tubo A — cor róseo-clara — C.T.T. positiva para a presença de inibidores. Tubo B — cor azul — indicativa de azul de metileno, não reduzido. Relacionar com a fig. 5.

QUADRO VI

Leite cru Padrão examinado após 24 horas

Leite	Bacterimetria		Colimetria	Redutasi- metria	Acidez	Pesquisa de H ₂ O ₂		Pesquisa de inibidores em geral		
	Placas col./ml	Método Breed bactérias/ml				Placas col./ml	A. Metileno minutos	°D	Guaiacol	Iodeto
cru										
Frigorificado	89 000 000	118 000 000	6 100 000	1	35	—	—	—	coagulado	—
Em ambiente	55

... Sem condições de exame

QUADRO VII

Leite cru com H₂O₂ examinado após 24 horas

Leite	Bacterimetria		Colimetria	Redutasi- metria	Acidez	Pesquisa de H ₂ O ₂		Pesquisa de inibidores em geral		
	Placas col./ml	Método Breed bactérias/ml				Placas col./ml	A. Metileno minutos	°D	Guaiacol	Iodeto
cru										
Frigorificado	41 000 000	57 000 000	110 000	110	24	—	—	+	Líquido	—
Em ambiente	87 000 000	115 000 000	800 000	20	38	—	—	+	Líquido	—

Passemos agora às duas demais etapas da trilogia proposta no início do trabalho.

2. PESQUISA DA MAIS LONGA PERMANÊNCIA DETERMINÁVEL DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (1/1 000ml), QUANDO ADICIONADO AO LEITE PADRÃO — CRU, FERVIDO, PASTEURIZADO COM OS RECURSOS DOS MÉTODOS CLÁSSICOS.

No leite cru, quer em ambiente como sob refrigeração, após cerca de 5 a 6 horas, a ausência analítica do peróxido, sub-detectável, foi a norma. Entretanto, para o leite pasteurizado, mesmo conservado em meio ambiente, o tempo de positividade das provas clássicas foi bem mais amplo — 16 horas.

Na amostra do mesmo leite refrigerado a 8°C, 240 horas ou mais, o peróxido de hidrogênio continuou presente; ao fim de 10 dias, suspendemos as pesquisas a êle relativas. Com o mesmo leite, porém fervido, no qual a presença de peróxido foi constatada pelo método do guaiacol, auxiliado pelo processo de TAPERNOUX³², ou pelo da oxidação do iodeto, as respostas foram semelhantes, com permanência muito longa do peróxido de hidrogênio, não desdobrado, pela destruição térmica havida, das diastases do leite.

3. EXAME DO LEITE TIPO "B" E "C", DE CONSUMO NA CAPITAL PELOS MÉTODOS CLÁSSICOS E PELOS ATUALMENTE PROPOSTOS.

De posse dos dados já analisados, passamos ao exame diário de amostras de leite cru destinado à produção do leite tipo "C", chegadas a São Paulo nas condições correntes, isto é, refrigeradas, e amostras de leite tipo "C" adquiridas no Comércio e obtidas simultaneamente em pontos diversos, em dias diferentes e de tôdas as principais marcas comerciais existentes à venda, principalmente Leco, Paulista, Poços de Caldas, União e Vigor. Também foram adquiridas, nas mesmas condições, amostras do leite tipo "B": Itahyê, Leco, Paulista, União e Vigor.

Foram examinados cerca de 100 amostras de cada grupo, num total de 300 amostras.

Conforme noção conhecida, pela sua não utilidade no caso, deixamos de realizar, para os leites pasteurizados, a bacterimetria pelo método de Breed e a redutasimetria.

Pelos métodos clássicos, o peróxido de hidrogênio *não foi evidenciado*, estando ausentes os sulfamídicos, aldeído fórmico, compostos de amônio quaternário e outros conservadores.

Não obstante, a pesquisa da presença de inibidores pelo C.T.T. e coagulação de prova revelou, no leite tipo "C" e no seu homônimo em estado de cru, a presença ativa de inibidor do crescimento bacteriano, na percentagem de 8% das amostras examinadas. O processo das placas com agar-germe manteve-se silencioso, não acusando a presença de inibidores nestas amostras.

No leite tipo "B", os inibidores foram apontados em 11% das amostras, tendo o processo da placa-germe evidenciado, em uma delas, a presença da penicilina, na potência de 0,03 U/ml. Insistimos em assinalar que o peróxido de hidrogênio não foi identificado em nenhuma das amostras, com os recursos da técnica clássica.

DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

Embora afirmem os autores que o peróxido de hidrogênio, quando colocado no leite cru, continua a agir, mesmo 10 a 20 ou mais horas após o seu adcionamento, não há meios conhecidos, pelo menos correntes, para determinar tal feito.

O mesmo não acontece com o aldeído fórmico, amônio quaternário, sulfamídicos, antibióticos e demais conservantes antissépticos, que continuam a ser determináveis, quantitativa e qualitativamente, dezenas de horas ou dias após a sua colocação.

O aldeído fórmico é evidenciado facilmente até em 10 p.p.m., o amônio quaternário, ou seus compostos, até 5 p.p.m., os sulfamídicos, em 0,005%, a penicilina, tetraciclina e cloranfenicol, a estreptomocina, respectivamente em 0,005 U/ml, 0,5 µg/ml e 5 U/ml^{20, 21 e 22}.

Em contraposição, a restrição horária se faz apenas para o peróxido de hidrogênio que, após 6 horas, não pode mais ser detectado no *leite cru*, quando pesquisado pelos métodos clássicos.

Dada a sua acentuada ação antisséptica, com redução de mais de 50 a 80% da flora microbiana, o seu baixo custo mesmo a 130 volumes, a pequena alteração do sabor do leite e principalmente a perda rápida da capacidade da determinação da sua presença, estes fatos constituem inegavelmente um considerável estímulo ao seu emprego.

Na verdade, no interior, o leite cru destinado à constituição do tipo "C" tem prazo de 24 horas para ser conduzido do local da ordenha e do entreposto de refrigeração à cidade, para a pasteurização. Pasteurizado, recebe mais 24 horas de prazo para a sua distribuição ao consumo, num total de 48 horas desde a ordenha^{5,6}.

Mas, excetuando o período inicial, nos locais de produção, onde geralmente o leite fica sob a refrigeração apenas da água corrente, a norma, no entreposto do interior, na usina de pasteurização e na distribuição, é a da rigorosa frigidificação do produto, em temperatura não superior a 5°C.

Então o calcanhar de Aquiles da produção leiteira, mesmo quando bem conduzida, reside juntamente naquele período inicial, quando após a ordenha é o leite transportado em latões, que aguardam à beira das estradas e rodovias, sob a proteção precária de abrigos rústicos, sob o impacto da temperatura ambiente, o momento de serem recolhidos e enviados ao entreposto.

Essa geralmente é a norma para os pequenos produtores de leite, devido à sua menor capacidade financeira, e que, embora não contribuam com o maior volume de leite *per capita*, se constituem na grande e absoluta maioria numérica.

E ao leite ordenhado principalmente pela madrugada, na chamada primeira ordenha, é facultado o prazo de até as 12 horas para dar entrada no entreposto de refrigeração, fornecendo portanto, à minoria infratora, mais de 6 horas habéis para o emprego do peróxido de hidrogênio, antes

da triagem higienico-sanitária realizada pela inspeção técnica, oficial.

Para o leite pasteurizado, o emprego desse conservante é desnecessário e impraticável. Desnecessário, dada a qualidade do tratamento térmico, e a ação cabal da frigidificação. Impraticável porque a redução calórica da flora bacteriana e das enzimas do leite permite uma longa permanência do peróxido de hidrogênio o que o torna facilmente determinável, mesmo pelos recursos clássicos.

Levando em consideração tais fatos e os resultados das pesquisas que fizemos em 1966 e 1967 — Presença de inibidores bacterianos no leite de consumo da Capital — com o encontro de 15 a 20% e de 9% de amostras do leite com inibidores, a maioria não identificada, a nossa atenção se voltou naturalmente para a possibilidade de ser o peróxido de hidrogênio essa presença incógnita^{19, 20}.

Os resultados obtidos experimentalmente com a colocação do conservador no leite cru e a sua pesquisa determinável, mesmo 24 horas após, já em pleno silêncio dos métodos clássicos, veio reforçar a nossa presunção.

E ressalta-se que, dos métodos clássicos, segundo os autores, os mais sensíveis são os que empregam as reações diastásicas^{27, 32} baseadas no fato de que a peroxidase no leite decompõe o peróxido de hidrogênio, libertando oxigênio atômico, nascente, capaz de se fixar sobre substâncias oxidáveis e, em muitas, produzir a formação de substâncias coloridas^{12, 14, 27}.

Entre essas substâncias oxidáveis, *em geral*, se encontram os polifenóis, como o guaiacol, certas aminas, como o p-fenileno-diamina, certos leuco-corantes, como a leuco-fenolfaleína e um número miscelânico de materiais, incluindo o ácido ascórbico, o triptofano, o ácido vanádico, os nitritos e os iodetos^{27, 30, 36}.

Entretanto, a reação rotineiramente empregada deriva do tradicional processo de Dupuy^{11, 18, 30} e põe em evidência a oxidação do guaiacol que, em presença do sistema peróxido-peroxidase, se transforma em guaiacoquinona, comunicando ao leite um nítida coloração vermelho-salmão.

Mas, se o leite foi fervido, houve destruição da peroxidase e o processo falha. Nesse caso, podemos lançar mão do meio prático de TAPERNOUX³², repondo no leite a peroxidase pelo acrescentamento da saliva ou utilizar um método puramente químico, como o da oxidação de potássio, ou do vanadato de amônio ou ácido vanádico, 1, 2, 30.

Mas quaisquer que sejam esses métodos, na prática esbarram com a restrição limitante daquele período máximo de 6 horas nas suas capacidades de determinação identificadora.

E quais seriam as conseqüências do emprego do peróxido de hidrogênio no leite, como conservador?

Do ponto de vista de Inspeção Sanitária, pelo falseamento induzido pela sua presença incôgnita, através da bacteriostase, na justeza da apreciação dos exames bacteriológicos e físico-químicos de rotina, só permitindo avaliar a qualidade atual do produto examinado, levando a considerar um leite altamente poluído como de boa qualidade, retira daqueles exames a sua elevada capacidade julgadora.

Tal prática, se disseminada, poderá, pela concorrência desleal, até o momento não passível de coibição, criar o desestímulo da produção higiênica do leite.

Na verdade o Regulamento Federal Brasileiro^{5, 6}, no seu artigo 540, estipula para o leite cru a prova da redutase, anunciando, no artigo 537, que só pode ser beneficiado leite considerado normal, proibindo o beneficiamento do leite que revele, na prova da redutase, contaminação excessiva, com descoramento em tempo inferior a 5 horas para o tipo "A", 3 h 30 m para o tipo "B" e 2 h 30 m para os demais tipos. Diz ainda, no artigo 540, parágrafo 2, que o número de germes por ml, antes da pasteurização, não deve ser superior a 10 000 para o leite tipo "A" e 500 000 para o tipo "B" e para os demais tipos, sem padrão bacteriológico determinado, quando em estado de cru que mantenha a acidez não inferior a 15°D nem superior a 20°D, e o seu tempo de redutase não inferior a 2 h 30 m.

E embora o artigo 514 advirta no seu parágrafo único que é proibido o emprego de substâncias químicas na conservação do leite, a não realização *em caráter liminar* da pesquisa da presença de substâncias inibidoras pode subverter a capacidade julgadora daqueles métodos de exame exigidos.

Então, podendo tôdas essas provas sofrer influência marcante dos inibidores, cuja presença é capaz de determinar um tipo fictício de leite, deve ser exigida liminarmente a sua ausência, para poderem ser aceitos como válidos os resultados fornecidos por aquelas provas de rotina.

Mas a veiculação, no leite, de conservantes antissépticos diversos, de antibióticos resultantes ou não do tratamento veterinário do rebanho leiteiro, de vestígios de substâncias químicas usadas na higienização em laticínios somente determináveis com o emprego de técnicas *ainda não correntes* no Brasil, traz implicações maiores do que as que possam imaginar *a priori*.

Como um *iceberg*, a parte visualizável do problema é muito pequena, e faz surgir uma reflexão ponderável: até a que ponto as estatísticas elaboradas pelos trabalhos que vêm sendo publicados, a respeito da avaliação bacterimétrica e colifórmica dos diversos tipos de leite consumidos no Brasil, podem ter sofrido a influência da presença incôgnita das substâncias inibidoras do crescimento bacteriano? E até que ponto o nosso Regulamento que periodicamente, ao se reformular se baseia nos dados obtidos por aqueles trabalhos, pode ter sido afetado?

Também é necessário entretanto ponderar, com TERPLAN e ZAADHOF³⁴, que no leite existe uma série de inibidores naturais, na verdade quase todos termo-lábeis, que, segundo a opinião dos autores, não teriam influência marcante nos processos vistos.

Do ponto de vista da industrialização do leite, principalmente na elaboração dos derivados fermentados — iogurte, coalhada e outros — as substâncias inibidoras inclusive o peróxido de hidrogênio, têm interferência sensível, com baixa da produção de ácido láctico e desmerecimento das suas boas qualidades organolépticas.

Sob o ponto de vista nutricional, ressaltaremos a redução do teor das diversas vitaminas, quando da presença do peróxido de hidrogênio no leite, ação desnaturante sobre as suas proteínas, produzindo modificação na estrutura macro-molecular das mesmas³⁵.

E com relação ao emprêgo oficial do peróxido de hidrogênio, como conservador, transcreveremos literalmente a opinião da Organização Mundial da Saúde, exarada já em 1960 e manifesta pelo seu Comité Mixto FAO/OMS d'Experts de l'Hygiène du Lait²⁵: "Le Comité approuve les conclusions auxquelles est parvenue la Réunion d'experts d'Interlaken (septembre 1957) sur l'emploi de l'eau oxygénée et autres agents de préservation du lait, à savoir: 1) Qu'en général l'emploi d'agents de préservation dans le lait n'est pas souhaitable et qu'en fait il ne peut être considéré que comme un mal nécessaire. Ce procédé ne peut être toléré que dans des cas exceptionnels et dans les pays chauds ou sous développés où il n'est pas possible de transporter rapidement le lait du lieu de production au centre de traitement ou d'assurer son refroidissement efficace..."

No item 5, adverte: "Qu'étant donné que l'eau oxygénée sert uniquement à retarder l'acidification du lait et qu'aux doses non nocives elle ne peut détruire certains types de micro-organismes pathogènes (notamment *Myco. tuberculosis*), le lait traité à l'eau oxygénée doit être soumis ensuite à un traitement thermique efficace avant sa distribution aux consommateurs ou au cours de sa transformation en produits laitiers.

No item 7, descreve: "Que si l'on a recours à la catalase pour faire disparaître les dernières traces d'eau oxygénée dans le lait, il faut s'assurer que la préparation soit irréprochable du triple point de vue enzymatique, chimique et bactériologique".

E assinala ainda no item 9: "En outre, le Comité voit un autre inconvénient très sérieux à employer l'eau oxygénée pour la préservation du lait dans le fait que cette pratique, si elle était appliquée systématiquement, inciterait presque certainement les producteurs de lait à abandonner tout nouvel effort pour améliorer les conditions

d'hygiène à la ferme et se traduirait sans doute par une baisse générale du rendement des élevages d'animaux laitiers".

Finalmente, consideramos que os dados dêste presente trabalho, tendo em vista o número pequeno das amostras examinadas, são relativamente deficientes para uma conclusão mais efetiva, julgamos que o mesmo deve ser repetido em carater mais amplo, de preferência com o leite cru advindo do interior e região por região, visando localizar os focos do leite inquinado e o seu saneamento dentro do prazo mais curto possível.

Tendo em vista o interesse do assunto, a Divisão de Contrôlo de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central da Laticínios do Estado de São Paulo elaborou estas investigações, visando fornecer elementos que evitem a transgressão do Regulamento Federal, em legítima defesa dos interesses dos bons produtores de leite e dos mais elementares princípios de Saúde Pública, como incentivo à melhora da *real* qualidade do leite.

RESUMO

Conforme recomendação de regulamento federal brasileiro — Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal — o leite *in natura*, da fonte de produção ao centro de beneficiamento, somente poderá ser conservado por meios físicos, principalmente pela refrigeração e após, pasteurizado. O emprêgo de outros conservantes — químicos ou bioquímicos — constituirá flagrante transgressão regulamentar.

Além do mais, a longa permanência no leite dos conservadores a êle adicionados e a sua fácil determinação torna o emprêgo dessas substâncias impraticável para fins excusos. Porém, tal fato não acontece com o peróxido de hidrogênio que, após 6 horas da sua colocação, não mais pode ser detectado, o que constitui um considerável estímulo para o seu emprêgo.

Levando em consideração o exposto e os resultados das pesquisas que fizeram os autores, em 1966 e 1967, que evidenciaram respectivamente 15-20% e 9% de presença de substâncias inibidoras do cres-

cimento bacteriano no leite de consumo de São Paulo, Capital, e na sua maioria não identificadas, tomaram os autores a iniciativa de elaborar este trabalho, no intuito de relacionar o peróxido de hidrogênio com aquelas substâncias incógnitas. Os processos empregados foram bioquímicos e foram utilizadas, entre outras, a prova do C.T.T., redutase do azul de metileno e emprêgo da placa com agar-germe de prova.

Os autôres conseguiram determinar, mesmo 24 horas ou mais da sua colocação no leite cru, a presença atuante do peróxido de hidrogênio, portanto, muitas horas após a sua não mais determinação pelos métodos clássicos correntes. Tais processos foram a seguir empregados no exame de amostras do leite tipo "B" e tipo "C" do consumo da capital de São Paulo.

Agradecimentos — Externamos nossos agradecimentos aos técnicos do Laboratório da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo — Daniel Bastos de Matos, Antônio José Xavier, Jair Gentilin e Nelson Zumpano pela valiosa cooperação nas pesquisas realizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — Standard methods for the examination of dairy products. 10 ed. New York, A.P.H.A., 1960.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — Standard methods for the examination of dairy products. 12 ed. New York, A.P.H.A., 1967.
3. APPLIED RESEARCH INSTITUTE — SCHARER modified phosphatase test. Instructions. New York, Applied Research Institute, 1958. Catalogue.
4. BENDIXEN, H. C.; BLINK, G. J.; DRUMMOND, J. C.; LEROY A. M. & WILSON, G. S. — Le problème du lait. Bulletin Trimestriel de l'organisation H'Hygiene 6:193-539, 1937.
5. BRASIL. — Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. (Aprovado pelo Decreto 30.691 de março de 1952). Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1952.
6. BRASIL — Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Decreto n.º 1255 de 25 de junho de 1962. Altera o Decreto 30.691, de 29 de março de 1952, que aprovou o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1962.
7. BURUIANA, L. M. & PAVLU, U. — L'influence du peroxyde d'hydrogène sur les protéines du lait. Etude polarographique. Milchwissens. chatf 18(12):613-7, 1963.
8. CECILIA, C. A. — Enciclopedia de la leche. Madrid, Espasa-Calpa, 1956.
9. FOSTER, E. M.; NELSON, F. E.; SPECK, M. L.; DOETSCH, R. N. OLSON, J. C. — Dairy Microbiology. New Jersey, Prentice-Hall, 1957.
10. HAMMER, B. W. & HABEL, F. J. — Dairy Bacteriology. 4th ed. Chapman & Hall, London, 1957.
11. INSTITUTO ADOLFO LUTZ — Metodos de análises bromatológicas. I. Análises químicas. São Paulo, Rev. Tribunaís, 1951.
12. JENNESS, R. & PATTON, S. — Principles of Dairy Chemistry. New York John Wiley, 1959.
13. KOSIKOWSKY, F. V.; HENNINGSON, R. W. & SILVERMAN, G. J. — The incidence of antibiotics, sulfa drugs and quaternary ammonium compounds in the fluid milk supply of New York State. J. Dairy Sci. 35:533-9, 1962.
14. LING, E. R. — A textbook of dairy chemistry. 3rd. ed. London, Chapman & Hall, 1956.
15. LOPES, C. F. — Observações sobre os fatores de insucesso e de recontaminação do leite pasteurizado. Bolm. Ind. Anim. 11:145-62, 1950.
16. LOPES, C. F. & FERRAZ, C. A. — Observações sobre o pre-aquecimento do leite. Sua influência sobre o teor bacteriano em geral e coliformes. Bolm. Ind. Anim. 15:139-84, 1956.
17. MELLO, A. & MASTROFRANCISCO, N. — Verificação sobre a presença do bacilo tuberculoso no leite da Capital. Rev. Ind. Anim. 1:25-42, 1938.
18. MELLO FILHO, A. — O leite: colimetria, fosfatimetria e contagem global. Rev. Inst. Adolfo Lutz 20:129-60, 1960.
19. MELLO FILHO, A.; SANDOVAL, L. A.; RODRIGUES, N. R. & XIMENES, J. — Pesquisas de substâncias inibidoras, em particular a penicilina, por métodos rápidos no leite tipo de consumo na Capital de São Paulo. Rev. Ass. Paul. Med., 69:264-5, 1966. Nota preliminar.

20. MELLO FILHO A.; SANDOVAL, L. A.; RODRIGUES, N. R. & XIMENES, J. — Inibidores bacterianos no leite de consumo da Capital. Rev. Inst. Adolfo Lutz 25/27:69-94, 1965/67.
21. MELLO FILHO, A.; SANDOVAL, L. A.; RODRIGUES, N. R.; XIMENES, J. & MATOS, D. B. Inibidores bacterianos, em especial a penicilina, no leite em pó de consumo da Capital. Rev. Inst. Adolfo Lutz 28:27-42, 1968.
22. MELLO FILHO, A. — Penicilina no leite de consumo da Capital e risco de sensibilização. Rev. Assoc. Paul. Med. 75:21-34, 1969.
23. MILK INDUSTRY FOUNDATION — Laboratory manual of analysis of milk and its products. Washington, D. C., Milk Industry Foundation, 1959.
24. MOSIMAN, W. — Catalase preparati6n. Archs. Biochem. Biophys. 33:488, 1951.
25. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ — Comité mixte FAO/OMS d'experts de l'hygiène du lait. Maladies transmises par le lait. Premier rapport. Genève, O.M.S., 1957. Sér. Rapp. Techn. 124.
26. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ — Comité mixto FAO/OMS d'experts de l'hygiène du lait. Deuxième rapport. Genève, O.M.S., 1960. Sér. Rapp. Techn. 197.
27. PIEN, J.; DESIRENT, J. & LAFONTAINE, D. — La recherche de l'eau oxygenée dans le lait. Le lait 34:133-45, 1954.
28. ROGICK, F. A.; PORTO, E. & GONÇALVES, M. — A mastite sub-clínica no rebanho produtor do leite tipo "B" e "C". Bolm. Ind. Anim. 22:91-120, 1964.
29. ROGICK, F. A. — Doenças transmissíveis ao homem pelo leite e derivados. Zootecnica. São Paulo (Brasil) 4(3):31-52, 1966.
30. ROSSEL, J. M. & SANTOS, I. — Metodos analíticos de Laboratorio Lactológico y Microbiología de las Industrias Lácteas. Barcelona, Labor, 1952. v. 2.
31. SCHARER, H. — A rapid phosphomonoesterase test for the control of dairy pasteurization. J. Dairy Sci. 21:21-34, 1938.
32. TAPERNOUX, A. — Recherche de l'eau oxygené dans les laits pasteurisés. Le Lait 8(1):410-11, 1928.
33. TEIXEIRA, C. G. — Aplicação da radiação na preservação de alimentos. Bolm.
34. TERPLAN, G. & ZAADHOF, J. — Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in der Milch — eine kurze Übersicht. Milchwissenschaft 22(12):761-71, 1967.
35. VILLARES, J. B. — Qualidade do leite tipo "C" em São Paulo. Bolm. Ind. Anim. 17: 55-81, 1959.
36. ZINNER, K. — Ativação oxigenio por espécies não clássicas. São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Tese de doutorando. 1967.

Recebido para publicação em 23 de fevereiro de 1970.

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA TOXOPLASMOSE.
LEVANTAMENTO SOROLÓGICO EM ÍNDIOS DO ALTO XINGU,
BRASIL CENTRAL (1)

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE TOXOPLASMOSIS EPIDEMIOLOGY.
SEROLOGIC SURVEY AMONG THE INDIANS OF THE UPPER XINGU RIVER,
CENTRAL BRAZIL

ROBERTO G. BARUZZI (2)

SUMMARY

The survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in 254 indians of the Upper Xingu River, Central Brazil, by means of the indirect immunofluorescence revealed 51.6% of positive reactions of titres equal or superior to 1/16. The aboriginal population of the Upper Xingu River is estimated in 600 indians, distributed into 9 tribes, living in a state of relative isolation maintaining their primitive habits and customs. The results have been compared with those of 2 other surveys made in different geographical areas of Brazil (in the Territory of Amapá and in the city of São Paulo), where the authors have used a serologic technique superposable to the one used in our survey. The results of the Upper Xingu, in its whole, do not significantly differ — as one might suppose, considering the life conditions of the indian — from those observed in the Territory of Amapá and in the city of São Paulo, i.e. in populations of a more advanced degree of civilization.

I — INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um parasita amplamente difundido do ponto de vista geográfico e biológico. Considerado como um protozoário, sua posição sistemática ainda se discute.

Foi pela primeira vez observado por SPLENDORE⁵⁹, em julho de 1908, causando uma infecção mortal em coelhos de seu laboratório. O exame microscópico das lesões evidenciadas no baço, fígado, gânglios linfáticos e intestino grosso, revelou a presença de corpúsculos parasitários, isolados ou agrupados, intra ou extra-celulares. Coube, entretanto, a NICOLLE & MANCEAUX⁴⁷, em 1909, a denominação de *Toxoplasma gondii*, dada ao parasita, o qual tinha sido observado por estes autores, em outubro de 1908, na Tunísia, no roedor africano gondi (*Ctenodactylus gondii*), usado como animal de laboratório.

A partir das observações de SPLENDORE e NICOLLE & MANCEAUX, foi progressivamente crescendo o número de espécies animais encontradas, naturalmente infectadas pelo *T. gondii*. Mesmo em nossos dias, a relação dos animais infectados ainda não pode ser considerada como definitiva. Esta relação inclui animais domésticos, como o cão e o gato, grande número de roedores peridomiciliares e selvagens, como o coelho, lebre, esquilo, cobra, camundongos e ratos. Macacos de várias espécies foram encontrados parasitados. Entre as aves, também, muitas são as espécies apontadas, como pombos, perizes, galinhas, patos, corvos e canários. O *T. gondii* tem sido identificado como o agente causador da morte de animais mantidos em cativeiro nos Jardins Zoológicos (RATCLIFFE & WORTH⁵³, 1951; MÖL-

(1) Tese de doutoramento apresentada à Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil, 1968.

(2) Do Departamento de Medicina Preventiva da Escola Paulista de Medicina (Prof. Dr. Magid Iunes), São Paulo, Brasil.

LER⁴⁴, 1962), e de animais de vida livre (CHRISTIANSEN & STIM⁹, 1951).

Embora, em sua grande maioria, o encontro do *T. gondii* se tenha registrado em casos isolados, têm sido descritas epizootias entre carneiros, na Inglaterra, por BEVERLEY & MACKAY², em 1962; em cães, nos E.U.A., por COLE *et alii*¹¹, em 1953; entre pombos e coelhos, no Congo, por WIKTOR⁶⁷, em 1950; entre ratos silvestres, na Escócia, por ELTON *et alii*¹⁹, em 1935; e entre galinhas, na Noruega, por ERICHSEN & HARBOE²⁰, em 1953 e em São Paulo, por NÓBREGA⁴⁸, em 1955.

Os estudos sobre a toxoplasmose, inicialmente ligados às espécies animais, despertaram grande interesse com o aparecimento dos primeiros casos humanos.

O primeiro caso teria sido registrado por CASTELLANI⁶, em 1914, no Ceilão. Tratava-se de um jovem de 14 anos, falecido após um longo período de febre intermitente, tendo sido encontrado no baço microrganismos, morfológicamente idênticos ao toxoplasma. FEDOROVICH²¹, em 1916, ao examinar o sangue de um menor de 10 anos, com febre e esplenomegalia, encontrou parasitas comparáveis aos descritos por CASTELLANI.

CHALMERS & KAMAR⁸, em 1920, no Sudão, referem a morte de três soldados, acometidos de processo febril, com hepatoesplenomegalia. Realizada a necrópsia de um deles, verificaram, em esfregaços do baço, ao presença de microrganismos idênticos ao *T. gondii*.

TORRES⁶¹, em 1927, no exame de um recém-nascido, falecido no 29^o dia de vida, com um quadro de contratura muscular generalizada e convulsões, refere o achado em cortes histológicos do cérebro, miocárdio, músculos esqueléticos e tecido celular subcutâneo, de um parasita que identificou como *Toxoplasma* ou *Encephalitozoon*, lembrando a possibilidade de tratar-se de uma afecção congênita.

Nos E.U.A., o primeiro caso humano foi descrito por WOLF & COWEN⁶⁸, em 1937, em recém-nascido, morto com um quadro de meningo-encefalomielite. WOLF, CO-

WEN & PAIGE⁶⁹, em 1939, apresentaram um novo caso, referente a uma criança falecida no 31^o dia de vida, com dispnéia e cianose intensas. Registraram a presença do parasita em lesões do sistema nervoso e conseguiram transmitir a doença a animais de laboratório, que revelaram lesões e parasitas semelhantes aos verificados na espécie humana.

Estas primeiras observações, indicando a possibilidade do *T. gondii* atingir o homem, foram seguidas de numerosas comunicações que vieram confirmar a existência da toxoplasmose como doença adquirida ou congênita.

Considerável progresso no estudo deste parasita foi possível com o aparecimento de técnicas laboratoriais, permitindo o diagnóstico sorológico da toxoplasmose.

O teste de neutralização, de SABIN & OLITSKY⁵⁵, em 1937, foi o primeiro utilizado. Consistia na injeção intradérmica, no dorso de coelho, de uma mistura do soro em estudo com toxoplasmas vivos. A injeção de toxoplasmas produzia no local da inoculação uma zona eritemato-papulosa ou pápulo-necrótica, atingindo seu máximo no 7^o ou 8^o dia. A existência no soro injetado de anticorpos toxoplasmáticos neutralizantes impedia o aparecimento da lesão cutânea (teste positivo). Atualmente, não é mais usado, sendo substituído por outros testes sorológicos, introduzidos no correr dos anos seguintes, conforme a relação seguinte:

- a) Teste de fixação do complemento, NICOLAU & RAVELO⁴⁶, 1937, WARREN & SABIN⁶⁶, 1942.
- b) Teste do corante, SABIN & FELDMAN⁵⁶, 1948.
- c) Teste de hemaglutinação, JACOBS & LUNDE³⁵, 1957.
- d) Teste de inibição de fluorescência, GOLDMAN³⁸, 1957.
- e) Teste de aglutinação direta, FULTON & TURK²⁶, 1959, e FULTON²⁵, 1965.
- f) Teste de floculação, SIIM & LIND⁵⁷, 1960.
- g) Teste de imunofluorescência indireta, KELEN *et alii*³⁹, 1962.

Deve-se, ainda, lembrar a prova de sensibilidade cutânea com a toxoplasmina, introduzida por FRENKEL²⁴, em 1948.

A divulgação destas provas laboratoriais trouxe considerável auxílio para o diagnóstico clínico desta parasitose e permitiu a realização de inquéritos sorológicos, que vieram demonstrar a existência de grande número de indivíduos portadores de anticorpos toxoplasmáticos, sem qualquer sintomatologia.

Ficou assim constatada a grande disseminação da "toxoplasmose-infecção" no homem e em animais, sendo relativamente rara a ocorrência da "toxoplasmose-doença".

Dois comunicações recentes sobre a ocorrência de surtos epidêmicos em coletividades humanas, verificados em Bragança (MAGALDI *et alii*⁴², 1967) e em São José dos Campos (MAGALDI *et alii*⁴³, 1967) no Estado de São Paulo, demonstraram outro aspecto importantíssimo da toxoplasmose.

Apesar de transcorridos 60 anos desde a descrição inicial de SPLENDORE e das numerosas investigações científicas realizadas, ainda se desconhece o mecanismo de transmissão do *T. gondii*, com exceção da forma congênita.

LEVI *et alii*⁴⁰, 1968, obtiveram o isolamento do parasita, a partir da saliva de 9 entre 10 doentes, acometidos de toxoplasmose, confirmando o achado de CATHIE⁷, em 1954. Tais observações revestem-se de grande interesse, indicando, eventualmente, uma forma de transmissão inter-humana, a ser pesquisada.

Acidentes de laboratórios têm demonstrado a possibilidade de o homem se infectar, quer por via oral, ao aspirar por êrro de pipetagem material contaminado, quer por via cutânea através da picada com agulha contaminada (BEVERLEY & MACKAY³, 1955), e mesmo pela mordedura de animais inoculados com o parasita (UMDENS-TOCK *et alii*⁶³, 1965).

O encontro de cistos de *T. gondii* em músculos esqueléticos do porco, vaca e carneiro (JACOBS *et alii*³⁷, 1960) ou em

determinados órgãos, particularmente o cérebro, e ainda, sua presença no leite, poderia sugerir uma forma de transmissão através destes alimentos, quando ingeridos crus ou mal cozidos (DESMONTS *et alii*¹⁸, 1965). No entanto a constatação de igual prevalência de anticorpos ao toxoplasma, em vegetarianos, por RAWAL⁵⁴, em 1959, e em indivíduos que ingerem unicamente carne bem cozida e leite pasteurizado, indica a existência de outras formas de transmissão do parasita. O toxoplasma foi também encontrado em ovos de galinha, por PANDE *et alii*⁵², 1961.

A capacidade do parasita, em sua forma cística, de resistir à ação dos sucos digestivos JACOBS *et alii*³⁶ (1960) permite sua manutenção na natureza, entre animais com hábitos de canibalismo e entre os carnívoros.

A grande frequência da toxoplasmose em cães e gatos, e a comprovação de que na fase aguda da infecção os parasitas podem ser eliminados pela saliva, urina e fezes, indicaria um provável meio de transmissão, considerando-se o íntimo contato destes animais com o homem.

A possibilidade da transmissão da toxoplasmose por artrópodos tem sido investigada. Através da inoculação de material, obtido pela trituração de insetos infectados, foi observada a transmissão do parasita a animais de laboratório (GIROUD *et alii*⁵³, 1952; NUSSENZWEIG & DEANE⁵¹, 1958), sendo no entanto, em condições experimentais, excepcional a transmissão pela picada de insetos infectados (M⁴ DEANE¹⁶, 1958).

A presença de toxoplasmas em ovos de *Toxocara cati*, evidenciada por HUTCHINSON³⁴, em 1965, veio chamar a atenção sobre a eventual importância dos nematodos na transmissão do parasita, abrindo novo campo de pesquisa.

Assim, constata-se que, apesar das várias teorias aventadas, não se conseguiu até o momento determinar o ciclo de vida do *T. gondii*. A ampla distribuição do parasita sugere um modo de transmissão simples e altamente eficaz, ou mesmo a existência de vários mecanismos de transmissão.

Inquéritos baseados no levantamento da prevalência de anticorpos ao toxoplasma em diferentes grupos humanos, ao lado do estudo dos hábitos e costumes dessas populações e dos fatores ecológicos presentes, representam um dos caminhos a serem percorridos no sentido de obtermos maiores conhecimentos sobre a cadeia de transmissão do parasita.

Dentro desta linha de investigação, resolvemos estudar os índios do Alto Xingu, no Brasil Central. Trata-se de um grupo humano que, em virtude do isolamento em que se manteve até recentemente, no centro de extensa região de cerrados e florestas virgens, preservou seus hábitos e costumes primitivos. Da mesma forma a fauna e a flora da região permanecem ao abrigo das modificações impostas pela penetração do homem civilizado. Consideramos digno de interesse o confronto dos resultados observados neste grupo indígena, com os registrados em inquéritos, realizados em populações com condições de vida muito diversas.

II — MATERIAL

A área abrangida pelo inquérito faz parte do Parque Nacional do Xingu, uma reserva indígena situada no norte do Estado de Mato Grosso.

O Parque Nacional do Xingu foi criado pelo governo federal em 1961, ocasião em que o interesse despertado pelas terras do Brasil Central, para a exploração agropecuária, punha em risco a existência das tribos indígenas localizadas na região. O Parque tem uma superfície de 22.000 km², estendendo-se ao longo do rio Xingu, tendo como limite norte uma linha que passa pela cachoeira de von Martius, e sul, uma linha que passa pela junção dos rios Culucne e Culisevu. Localizada na zona de transição do Brasil Central para a Amazônia, a área do Parque apresenta características naturais, fauna e flora, destas duas grandes regiões brasileiras. No sul, avistam-se ainda as últimas manchas do cerrado do planalto central e o restante é mata densa, que por sua exuberância e coloração se enquadra no tipo amazônico.

O Parque Nacional do Xingu pode ser dividido do ponto de vista administrativo e em relação às características de vida das tribos indígenas, situadas em seu interior, em duas partes: uma norte, tendo como centro o Pôsto de Diauarum, e outra sul, tendo como centro o Pôsto Leonardo Vilas Boas.

No presente inquérito, estudamos a parte sul do Parque, que representa cerca de 50% de sua área total e abriga uma população indígena mais homogênea em seus hábitos e costumes. Esta região é conhecida como ALTO XINGU e assim será por nós referida.

O Alto Xingu situa-se entre 12° e 13° de latitude sul e 50° e 54° de longitude oeste de Greenwich. Sua altitude média é de 250 metros. Apresenta duas estações no ano, o "inverno" ou estação das chuvas, de outubro a março; e "verão" ou estação da seca, de abril a setembro. A temperatura máxima diária mantém-se elevada no decorrer do ano, oscilando entre 26° a 34°C. Durante a noite registra-se queda acentuada da temperatura, mais marcante no período da seca.

A região é cortada por muitos rios, destacando-se os rios Culucne, Ronuro e Batovi, que, no lendário ponto, chamado pelos índios de Morená, se unem para formar o rio Xingu. Encontram-se ainda várias lagoas extensas e numerosos cursos de água de pequeno vulto. O rio Xingu cruza o Parque do sul para o norte, indo lançar-se no rio Amazonas após um percurso de 1.200 km. As cachoeiras intermináveis do médio curso (180 km) sempre constituíram um sério obstáculo aos viajantes vindos do norte. Isto aliado à existência de tribos indígenas arredias, localizadas acima das cachoeiras, tornaram a região do Alto Xingu um refúgio seguro para alguns grupos indígenas.

Representa o avião o principal meio de comunicação com o Alto Xingu, sendo a penetração por terra difícil, de certa forma impraticável. O núcleo civilizado mais próximo, Xavantina, dista 300 km. Ocasionalmente, no período da cheia, cargas, vindas de São Paulo por caminhão, podem

ser transportadas por água, a partir de Garapu, às margens do rio Sete de Setembro, até o Parque, com o uso de batelões ou balsas, durando a viagem, cêrca de oito dias.

No Posto Leonardo Villas Boas permanece o Diretor do Parque Nacional do Xingu, alguns auxiliares e, por vêzes, pesquisadores. São os únicos indivíduos de raça branca encontrados na região.

Os índios do Alto Xingu não têm contato com outros grupos humanos situados fora de sua área e raramente com os indígenas que habitam a parte norte do Parque. Podem ser considerados como um grupo humano isolado, uma ilha populacional.

HABITANTES DA ÁREA PESQUISADA

A área pesquisada é habitada por nove tribos indígenas que, segundo estimativas da Administração do Parque, em 1966, compreendiam 610 indivíduos.

Estas tribos vêm sendo estudadas por equipes médicas ligadas ao Instituto de Medicina Preventiva da Escola Paulista de Medicina, com as seguintes finalidades:

1 — Determinar as condições de saúde do índio do Alto Xingu;

2 — Estudar suas condições biológicas;

3 — Estabelecer as medidas médico-profiláticas necessárias à sua preservação.

Como membro integrante destas equipes médicas, realizamos o inquérito sorológico sobre a ocorrência de anticorpos ao *Toxoplasma gondii* entre os indivíduos examinadores, em julho e setembro de 1966.

a) Distribuição por tribos

As tribos indígenas do Brasil se dividem em quatro grandes grupos, conforme o tronco lingüístico a que pertencem. No Alto Xingu estão ausentes, apenas, representantes do grupo Jê. Assim temos:

Tribo	Grupo lingüístico
Auetí (Aweti)	Tupi
Camaiurá (Kamaiura)	Tupi
Iaualapiti (Iawalapiti)	Aruaque
Meinaco (Meinaku)	Aruaque
Uaurá (Waurá)	Aruaque
Calapalo (Kalapalo)	Caribe
Cuicuro (Kuikuro)	Caribe
Matipu (Matipuhy)	Caribe
Nafuquá (Nahuquá)	Caribe

Segundo VILLAS BOAS⁶⁴, em 1968, — “indícios de ocupação da área, com grandes áreas derrubadas a machado de pedra, vestígios de antigas aldeias, cacos de cerâmicas etc., levam-nos a crer que a ocupação do Alto Xingu remonta há séculos”.

Narrativas de viajantes do século passado fazem menções aos índios do Alto Xingu. Descrição primorosa dos hábitos e costumes destas tribos encontra-se no livro: “Entre os Aborígenes do Brasil Central”, de Karl von den STEINEN⁶⁰, publicado em 1894.

b) Idade e sexo dos indivíduos examinados

Em geral os índios compareciam ao local do exame em grupos pertencentes a uma mesma tribo. Apresentavam-se com a esposa e filhos, insistindo para que todos fôssem igualmente examinados. Salvo a natural resistência das crianças menores, não tivemos nenhuma recusa por parte dos demais. Alguns índios que, eventualmente, estavam pescando ou trabalhando na lavoura, compareciam nos dias imediatos ou eram examinados por ocasião de nossas visitas às aldeias. Foram examinados 254 indivíduos, sendo 130 do sexo masculino e 124 do sexo feminino.

A idade do índio foi calculada de forma aproximada. Baseamo-nos no aspecto físico, em alguns informes fornecidos pelo pessoal auxiliar do Parque e no relacionamento com os demais familiares. Para as crianças e jovens contávamos também com o auxílio da ficha odontológica. A representação por grupos etários figura no quadro I:

QUADRO I

Índios examinados no Alto Xingu, 1966, distribuição segundo o grupo etário e o sexo.

Grupo etário (anos)	Sexo		Total	
	Mascu- lino	Femi- nino	N.º	%
0 — 5	18	25	43	16,9
5 — 10	21	17	38	14,9
10 — 20	26	23	49	19,3
20 — 30	27	22	49	19,3
30 — 40	26	26	52	20,4
40 — 50	8	7	15	5,9
50 — 60	4	4	8	3,1
Total	130	124	254	100,0

c) Distribuição por famílias

Entre os índios do Alto Xingu, a poligamia é aceita, mas não é freqüente, e o número de espôsas não ultrapassa três. O casamento nasce em geral de acordos realizados entre as famílias, evitando-se uniões entre consanguíneos próximos.

O homem logo após a puberdade permanece preso no interior da taba por períodos de três a quatro meses, recebendo alimentação abundante, destinada a favorecer seu desenvolvimento físico. Os que revelam força e agilidade para as lutas corporais permanecem reclusos por períodos maiores, como futuros lutadores da tribo.

A jovem, marcado o casamento, inicia um período de reclusão no interior da oca, em média de dez meses, durante os quais pode ser vista unicamente pelos parentes. Casa-se ao deixar a reclusão.

De maneira geral, o homem casa-se em idade superior à da mulher. Dos 14 aos 18 anos (14 — 18), registramos a presença de 7 homens, nenhum casado, e 12 mulheres, das quais 10 eram casadas. Dos 18 aos 22 anos (18 — 22) tivemos 15 homens, dos quais 7 casados, e 10 mulheres, todas casadas. A idade mínima observada, entre os indivíduos casados, foi de 18 anos

para o sexo masculino e 14 para o feminino.

No Alto Xingu são freqüentes os casamentos inter-tribais, fato já registrado por STEINEN⁶⁰, em 1887. Tal prática talvez se tenha acentuado nos últimos anos, em virtude do reduzido número de membros de cada tribo e da proibição dos casamentos consaguíneos.

Encontramos certa dificuldade para estabelecer os grupos familiares entre os indivíduos examinados, pois, além dos pais, irmãos e filhos, não se conseguiu determinar com exatidão outros graus de parentesco e existe a recusa dos índios de pronunciarem o nome dos parentes por parte do cônjuge, ou seja, sogros e cunhados, por acreditarem que trariam malefícios à pessoa citada. Segundo o levantamento realizado, os 254 indígenas incluídos no inquérito estariam distribuídos por 83 famílias:

QUADRO II

Número de famílias do Alto Xingu, segundo o número de seus membros incluídos no inquérito sorológico para toxoplasmose, 1966.

Número de pessoas examinadas por família	Número de famílias
1	21
2	16
3	16
4	14
5	10
6	2
8	2
9	1
10	1
Total	83

A existência de 21 eventuais famílias representadas por um único membro decorreu, principalmente, da presença de indivíduos solteiros, para os quais não se conseguiu estabelecer o relacionamento familiar.

CARACTERÍSTICAS DA VIDA INDÍGENA

Cada tribo do Alto Xingu tem sua própria aldeia, com exceção dos Nafuquá e Matipu que, pelo pequeno número de membros de ambas, constituíram aldeia em comum.

As aldeias do Alto Xingu obedecem a um mesmo tipo geral, são formadas por várias casas ou ocas, dispostas em círculo em torno de um pátio extenso, no qual são realizadas as festas e cerimônias e sepultados os mortos importantes da tribo. As aldeias distam entre si, por vezes, dezenas de quilômetros e se situam próximas de rio ou lago, onde os indígenas se abastecem de água.

As ocas são, as vezes, bastante espaçadas, chegando a medir 24 m de comprimento, 12 m de largura e 8 m de altura. São cobertas com folhas de sapé ou burití, sobre uma estrutura formada por varas amarradas. O interior da oca mantém-se no decorrer do dia na penumbra e sua temperatura é amena em relação ao exterior. Os habitantes de uma mesma oca estão ligados entre si por laços de parentesco. Na aldeia Camaurá encontram-se 7 ocas, habitadas por 110 índios; na aldeia Iaualapiti são 4 ocas para 39 habitantes.

Os índios utilizam rédes para dormir, as quais são dispostas em grupos no interior da oca, de forma a deixarem a parte central livre para a circulação. As rédes são tecidas pelas mulheres a partir do algodão nativo e da fibra da palmeira burití. Durante a noite, junto a cada grupo de rédes é mantida uma pequena fogueira para fornecer o aquecimento necessário.

Cada aldeia tem seu chefe, o qual possui autoridade apenas relativa sobre os demais, sendo o responsável pelas festas e cerimônias, bem como pela observância das tradições da tribo. O pajé é o chefe espiritual e os índios lhe atribuem o dom de curar as doenças, provocadas pela influência dos espíritos.

Na vida familiar, homens e mulheres têm obrigações definidas. Os trabalhos da lavoura, caça e pesca são atribuições mas-

culinas. Na pesca utilizam habitualmente o arco e a flecha, mas na ocasião da vazante há pescarias coletivas, nas quais empregam o timbó, um cipó que macerado e agitado na água desprende uma substância tóxica para os peixes. São funções da mulher: o preparo dos alimentos, a fabricação de panelas de barro, a confecção de rédes e a retirada de água do rio ou lago próximo para uso doméstico.

Os índios têm agricultura extensiva e itinerante, cujo principal produto é a mandioca (*Manihot succulenta*), seguida do milho (*Zea mays*) e da batata-doce (*Ipomoea batatas*).

A alimentação do índio do Alto Xingu, baseia-se fundamentalmente na mandioca e no peixe. Este, assado sobre um braseiro ou cozido em água, constitui a principal fonte proteica. Quando desejam conservar os peixes por vários dias, os mesmos são moqueados sobre a fogueira. Apreciam unicamente os peixes de escamas, entre os quais destacam-se os seguintes: tucumaré (*Cichla multifasciata*), matrinchã (*Brycon hilari*), curimatá (*Prochilodus hartii*) e páau (*Astyanax sp*).

Na alimentação habitual não figura animal de pelo ou de pena. Em raras ocasiões comem macacos (*Allonata caraya* ou *Cebus sp*), reservados para determinados doentes. Entre as aves apreciam o mutum (*Crax sp*) e o jacú (*Penelope pileata*), também raramente consumidos.

A mandioca está sempre presente na alimentação, sob a forma de mingau ou de biju, massa assada sobre o fogo. Segundo SILVA⁵⁸, 1966, pode-se calcular por adulto o consumo de 1 a 1,5 litro de mingau e 400 gramas de peixe ao dia, pêso do peixe inteiro, cru.

Além do peixe e da mandioca, figuram na alimentação, mas de forma menos frequente, milho, batata-doce e uma grande variedade de frutos selvagens. Durante o mês de agosto, quando o tracajá (*Podocnemis cayennensis*) deposita seus ovos nas praias, estes são recolhidos pelos indígenas, sendo as gemas ingeridas cruas ou cozidas. Novembro é o mês do piqui (*Caryocar sp*), um fruto de polpa gordurosa, muito apreciada pelos índios.

Os habitantes do Alto Xingu desconhecem o uso do nosso sal de cozinha, mas utilizam em algumas ocasiões um "sal" obtido das folhas do aguapé, uma planta aquática. As folhas são secas ao sol e a seguir incineradas. Das cinzas é extraído o "sal", que apresenta cor esbranquiçada e tem em sua composição 74g% de cloreto de potássio e 0,194 g% de cloreto de sódio.

Os índios não possuem horários determinados para as refeições, comem de forma moderada várias vezes ao dia. As crianças são alimentadas no seio materno até mais ou menos três anos de idade, com um suplemento alimentar fornecido pelo mingau de mandioca ou pelo caldo de peixe cozido.

ANIMAIS DOMICILIARES E PERI-DOMICILIARES

Presença de Vetores

O índio do Alto Xingu não possui animais de criação ou carga. Nas aldeias não existem cavalos, burros, bois, porcos, cabras, coelhos e gatos, animais comuns nos povoados brasileiros.

O cão é o animal mais encontrado nas aldeias, sendo sua introdução na área relativamente recente. STEINEN⁶⁰, em 1887, assinala a ausência do cão doméstico no Alto Xingu, admitindo-se que foi introduzido por ocasião da Expedição Roncador-Xingu, em 1946. São vistos com frequência no interior da habitação em contato constante com seus moradores, principalmente crianças e muitas vezes comem em recipientes usados igualmente pelo homem.

No interior da oca encontra-se com frequência o macaco, sendo os mais comuns o macaco-prego (*Cebus libidinosus*) e o macaco de cheiro (*Saimiri sciurus*).

Algumas aves são mantidas presas no interior da habitação, como papagaios (várias espécies do gênero *Amazona*) periquitos (*Brotogeris tirica*), araras (*Ara macao* e *Ara araruana*) e tucanos (*Rhamphastos toco* e *Rhamphastos m. monilis*). Destas aves os índios retiram penas para a confecção de cocares, brincos, colares, etc. Por vezes em torno da habitação encontra-se o

mutum (*Crax sp*), ave selvagem, aprisionada e domesticada. Ausência de galinhas e patos. No centro das aldeias pode-se ver um cone formado por troncos e galhos, dentro do qual os índios aprisionam um gavião real (*Harpia harpya*), muito apreciado por sua penas.

Existem várias espécies de ratos silvestres que a noite invadem a oca, à cata de restos alimentares. Em relação aos artrópodos, registra-se a presença, em grande quantidade, de baratas (*Periplaneta americana* e *Blatella germânica*). Até o momento não foram observados triatomídeos domésticos. Raros muscídeos silvestres e presença em pequeno número da mosca doméstica (*Musca domestica*). Quanto aos insetos hematófagos, destacam-se pela presença relativamente abundante em suas épocas de maior densidade: mutucas (tabanídeos), pium (simulídeos) e maruim (culicídeos). Entre os anofelinos predomina no interior das habitações o *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, e em capturas efetuadas no exterior encontram-se o *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* e *Anopheles (Arribazaglia) minor*.

Deve-se, destacar, ainda, a presença de pulgas (*Ctenocephalides felis*) que, principalmente na época da seca, podem ser encontradas em grande número. Os índios do Alto Xingu são portadores frequentes de piolhos da cabeça, cuja identificação está sendo realizada por CONTINHO & d'ANDRETTA¹², 1968, tendo sido adiantado que se trata de espécie do grupo parasita de antropóides.

O HOMEM DO ALTO XINGU, SUAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Os índios do Alto Xingu vivem habitualmente nus, usando apenas alguns ornamentos como brincos e colares. Os pêlos do corpo são retirados por arrancamento.

Os homens passam sobre o corpo uma tinta vermelha, obtida do maceramento de sementes do urucum com óleo de palmeira, que persiste por vários dias e é periodicamente renovada. Nos dias de festa executam desenhos caprichosos, utilizando também uma tinta preta, retirada do genipapo.

As mulheres têm cabelos longos, soltos sobre os ombros e enfeitam-se com colares de contas e penas. Usam sobre o púbis uma pequena membrana, o "uluri" feita com casca de uma árvore e prêso por um

fino cordão. Seu uso constitui uma característica marcante das tribos do Alto Xingu.

A determinação da estatura e do peso corporal de 118 índios examinados, adultos, dos quais 64 eram do sexo masculino e 54 do sexo feminino, acusou:

QUADRO III

Índios do Alto Xingu adultos, segundo a estatura e peso, 1966.

Sexo	Estatura (m)		Peso corporal (kg)	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
Masculino	1,620	0,051	63,07	7,11
Feminino	1,500	0,047	49,39	5,58

QUADRO IV

Índios do Alto Xingu, adultos segundo a estatura e o sexo, 1966.

Estatura (m)	Sexo		Total
	Masculino	Feminino	
142 — 146	—	12	12
146 — 150	1	20	21
150 — 154	4	12	16
154 — 158	9	8	17
158 — 162	13	1	14
162 — 166	25	—	25
166 — 170	9	1	10
170 — 174	1	—	1
174 — 178	2	—	2
Total	64	54	118

QUADRO V

Índios do Alto Xingu, adultos, segundo o peso e o sexo, 1966.

Peso kg	Sexo		Total
	Masculino	Feminino	
38 — 42	—	4	4
42 — 46	—	15	15
46 — 50	3	16	19
50 — 54	4	6	10
54 — 58	9	10	19
58 — 62	15	2	17
62 — 66	15	1	16
66 — 70	8	—	8
70 — 74	5	—	5
74 — 78	4	—	4
78 — 82	1	—	1
Total	64	54	118

ESTADO DE SAÚDE DA POPULAÇÃO EXAMINADA

a) *Exame clínico*

Todos os indivíduos incluídos no presente inquérito foram submetidos a exame clínico. O interrogatório referente aos antecedentes pessoais e sintomatologia atual, pouca ou nenhuma informação pôde fornecer, em virtude das dificuldades linguísticas existentes.

Nos hábitos pessoais menciona-se o banho nos rios ou lagos várias vezes ao dia. A água para beber e para o preparo dos alimentos é recolhida pelas mulheres, em grandes panelas de barro, em rio ou lago próximo da aldeia. As dejeções humanas são feitas dentro da mata, não sendo, em geral, encontradas fezes humanas ao redor da habitação.

O índio do Alto Xingu tem compleição atlética, musculatura forte, cintura escapular bem desenvolvida e cintura pélvica pequena. Ausência de obesidade.

Ao exame físico não foram observados indivíduos ictericos. Ausência de lesões cutâneas sugestivas de leishmaniose. Uma mulher, com cerca de 36 anos, apresentava lesão na face, na região geniana esquerda, por possível carcinoma baso-celular. Não foi observada a ocorrência de bócio.

Em 35 índios registrou-se elevação da temperatura axilar: entre 37°C e 37,5°C, em 30 examinados, e entre 37,6°C e 38°C nos 5 restantes. A ocorrência de febre, em 11 desses indivíduos, foi atribuída a processo gripal, em virtude das manifestações catarrais das vias aéreas superiores, presentes. Sinais de amigdalite crônica foram vistos em 20 pessoas, sem elevação da temperatura axilar.

Os exames odontológicos de 123 índios, incluídos na população estudada, foram realizados por TUMANG & PIEDADE⁸², em 1966 e comparados com exames feitos entre habitantes de Piracicaba, Estado de São Paulo. A prevalência de cáries foi mais elevada no grupo civilizado, com exceção da dentição mista, na qual houve predomi-

nância de cáries nos índios. A prevalência de doenças periodontais foi maior no grupo indígena.

Lesões oculares foram evidenciadas, em uma mulher de 45 anos, com catarata bilateral, e em um homem de 52 anos, com lesões granulomatosas no globo ocular esquerdo e secreção purulenta. Este índio, foi o único a apresentar comprometimento acentuado do estado geral, caquexia.

Ao exame dos gânglios linfáticos não foi observada a presença de comprometimento ganglionar generalizado em nenhum dos indivíduos examinados. Aumento de gânglios linfáticos regionais foi registrado em 15 índios e ocorreu com mais frequência nas cadeias ganglionares submaxilares e inguinais. Os gânglios, aumentados à palpação, não apresentavam sinais de fistulização e não ultrapassavam 2 x 1 cm.

Na propedêutica pulmonar evidenciou-se a presença de roncos e estertores sub-crepitantes de grossas bolhas, em 6 índios. Não foram encontrados sinais propedêuticos sugestivos de asma brônquica.

No sistema cárdio-vascular não se registrou a ocorrência de insuficiência cardíaca. Ausência de arritmia cardíaca. Presença em alguns indivíduos de sopro sistólico, pouco intenso, audível no mesocárdio ou no fóco mitral, sem outros achados na propedêutica cardíaca. As cifras de pressão arterial variavam de 90 a 120 mm Hg para a máxima, de 60 a 80 para a mínima.

Ao exame do abdomen constatou-se gravidez em três índias, em tórno do 4º e 5º mês. Quatro crianças menores de 3 anos, apresentavam hérnia umbelical.

O fígado foi palpável na maioria dos indivíduos examinados. Se considerarmos este órgão, para efeitos práticos, aumentado de volume quando palpável a mais de 4 cm (dois dedos) da reborda costal direita, na direção da linha hemi-clavicular direita, pode-se admitir a presença de hepatomegalia em 66 índios. A hepatomegalia foi acompanhada, nos 66 casos, de aumento de volume do baço.

A esplenomegalia foi o achado mais freqüente do exame físico. Para a sua avaliação recorremos ao índice esplênico de Boyd, que adota 4 tipos, desde baço 0, quando o órgão não é palpável, até baço 4, estendendo-se além da cicatriz umbilical. Entre

êstes dois extremos temos o baço 1, palpável na reborda costal, o baço 2 até a metade da linha costo-umbilical e o 3 entre esta linha e a cicatriz umbilical. Os resultados são vistos no quadro VI.

QUADRO VI

Índios do Alto Xingu, 1966, segundo o índice esplênico e a idade

Índice esplênico						
Idade (anos)	0	1	2	3	4	Total
0 — 2	4	—	6	1	—	11
2 — 10	16	15	30	6	1	68
10 — 20	5	11	16	9	2	43
20 — 30	5	2	15	12	14	48
30 — 60	9	8	20	19	14	70
<i>Total</i>	39	36	87	47	31	240

Um rapaz, de 18 anos, apresentava um quadro neurológico de polineurite. Os índios atribuíam seu estado físico à ação de uma erva, administrada aos jovens do sexo masculino para estimular o desenvolvimento físico.

As crianças examinadas mostraram bom estado nutritivo. Não se observou caso de distrofia.

b) *Provas de laboratório*

Para melhor avaliação das condições de saúde do indígena, são apresentados os resultados do estudo hematológico realizado por SILVA⁵⁸, 1966, e do inquérito sobre a ocorrência de êntero-parasitas, efetuado por d'ANDRETTA¹³, 1968.

Foram os seguintes os resultados do exame hematológico de 69 índios do Alto Xingu:

Exame hematológico

1. *Série Vermelha*

<i>n.º gl/ml</i>	<i>Índios</i>
acima de 4 500 000	34
de 4 000 000 a 4 500 000	30
inferior a 4 000 000	4

Hemoglobina

<i>Valores em g%</i>	<i>Índios</i>
Superiores a 12	45
entre 10 e 12	22
inferiores a 10	2

Dosagem de ferro sérico

Considerando-se o valor normal de ferro sérico, situado entre 60 e 150 ug%, foram encontrados apenas 4 índios com valores abaixo do normal (1 mulher e 3 crianças)

2. *Série branca*

<i>n.º gl/ml</i>	<i>Índios</i>
acima de 9 000	11
de 5 000 a 9 000	53
inferior a 5 000	5

Quando à forma leucocitária, os achados mais freqüentes foram: neutropenia em 52% dos casos estudados, eosinofilia em 88% e linfocitose em 46%.

O inquérito sobre êntero-parasitas intestinais incluiu 139 índios do Alto Xingu. As amostras de fezes foram mantidas no

MIF, meio conservador, até o momento de serem examinadas. O exame proto-parasitológico obedeceu à seguinte seqüência:

- a) centrifugação, exame do sedimento
- b) Willis, a partir do sedimento
- c) Sedimentação (método de Hoffmann *et alii*), de 24 horas.

Na pesquisa de helmintos, 116 amostras foram positivas. A ancilostomíase esteve presente em 81% dos indivíduos examinados; *Ascaris lumbricoides* em 18%; *Enterobius vermicularis* em 13%; *Strongyloides stercoralis* em 11%. Não foram observados ovos de *Trichuris trichiura*. O número de exames negativos para helmintos foi de 23, ou seja, 17% do total de amostras examinadas.

Dos indivíduos com ancilostomíase, 101 apresentaram menos de 2 600 ovos por grama de fezes, sendo considerados como portadores de infecção leve, 12 ultrapassaram tal limite.

Quanto aos protozoários, a *Entamoeba coli* esteve presente em 87% dos exames; o complexo "histolytica", em 61%; a *Iodamoeba butschlii*, em 39%; a *Endolimax nana*, em 38%; a *Giardia lamblia*, em 28%; a *Chilomastix mesnili*, em 17%; o *Balantidium coli*, presente apenas em um exame. Dos 139 indivíduos examinados, 20 ou seja 14% apresentaram exame de fezes negativos para protozoários.

c) *Comentários sobre os achados clínicos e laboratoriais*

A esplenomegalia, presente em grande número dos indivíduos examinados, merece alguns comentários. O inquérito sobre a ocorrência de parasitas intestinais não acusou a presença de ovos de *Schistosoma mansoni* em nenhuma das amostras de fezes.

Durante a permanência das equipes médicas no Alto Xingu, foram atendidos vários indígenas, principalmente crianças, com surtos febris, provocados pela malária. Para determinar a prevalência da malária na região, d'ANDRETTA *et alii*¹⁴ vêm realizando inquérito parasitário através de gotas espessas e esfregaços de sangue de seus habi-

tantes. Resultados parciais referentes a 127 índios, mostraram 70 casos positivos, ou seja 55%, dos quais 3 apresentaram parasitismo concomitante pelo *P. vivax* e *P. falciparum*. Nos demais (67) a distribuição percentual foi a seguinte:

Positivos para	%
<i>Plasmodium vivax</i>	47,7
<i>Plasmodium falciparum</i>	35,8
<i>Plasmodium malariae</i>	16,4

Para uma apreciação superficial, foi feita investigação sorológica através da pesquisa de anticorpos ao plasmódio, pela técnica da imunofluorescência indireta, em 23 soros de crianças menores de 10 anos, escolhidos ao acaso entre as amostras utilizadas no inquérito de toxoplasmose. As reações foram efetuadas pelo Dr. J. Meuwissen, no Departamento de Higiene da Universidade Católica de Nijmegen, Holanda, sendo empregado como antígeno o *Plasmodium fieldi*.

Conforme se verifica pelo Quadro VII houve apenas uma reação negativa considerando-se 1:20 como a diluição inicial. Os soros pertencentes a três crianças, com 45 dias, 60 dias e 12 meses de idade, apresentaram, respectivamente, títulos de 1:160, 1:80 e 1:40, demonstrando, pela presença de anticorpos ao plasmódio, que a malária na região incide precocemente. Das 23 crianças examinadas, 17 apresentavam esplenomegalia ao exame físico.

QUADRO VII

Ocorrência de anticorpos séricos ao plasmódio, em 23 crianças do Alto Xingu, 1966, pela técnica da imunofluorescência indireta

Título do soro 1:	Frequência
< 20	1
20	2
40	5
80	5
160	6
320	3
640	1
Total	23

As considerações anteriores permitem levantar a hipótese de que a esplenomegalia, presente em grande parte da população examinada, decorre de surtos repetidos de malária.

III — MÉTODOS

As atividades da equipe médica eram centralizadas no Pôsto Leonardo Villas Boas, onde se podiam contar com algumas instalações, tais como farmácia, ambulatório médico e um pequeno laboratório, que dispunha de centrifugador, microscópio, geladeira e estufa. Os indígenas para maior facilidade do trabalho, eram instados a comparecerem ao Pôsto, sendo posteriormente visitadas algumas aldeias para exame dos indivíduos que, por razões várias, não tivessem atendido à solicitação dos responsáveis pelo Parque.

Estabeleceu-se uma rotina de trabalho, pela qual o índio era inicialmente identificado, com o registro do nome, tribo e aldeia em que morava. Seguia-se o registro do sexo, idade aparente, estado civil, número de filhos e sexo, nome dos pais e tribos a que pertenciam. A identificação pessoal era complementada com uma foto 3 x 4 cm e com a impressão digital do polegar direito. Procedia-se, então, ao exame físico geral e exame odontológico, e retirava-se por punção venosa, 5 a 10 ml de sangue.

O sangue obtido era colocado em tubos secos, ocorrendo a retração do coágulo à temperatura ambiente. Os soros eram separados por centrifugação, em seguida aspirados e injetados em frascos estéreis. Estes, colocados em geladeira, à temperatura de 4°C, após um período não superior a oito dias, foram transportados por avião no interior de recipientes de isopor, contendo blocos de gelo, diretamente à São Paulo, onde foram conservados à temperatura de -20°C.

TECNICA

1. Reação de imunofluorescência indireta

Para a pesquisa de anticorpos sericos contra o *Toxoplasma gondii*, na população estudada, usamos a reação de imunofluorescência indireta, conforme técnica pre-

nizada por CAMARGO⁴ (1964). As reações foram por nós realizadas, no segundo semestre de 1966, no "Instituto de Medicina Tropical de São Paulo", após um período de treinamento destinado a nos familiarizarmos com seus detalhes técnicos.

A reação usada consiste genéricamente em colocar-se o sôro a ser examinado, em várias diluições, sobre toxoplasmas fixados em lâminas de microscopia. Em seguida as lâminas são lavadas e sobre elas deposita-se o sôro antiglobulina humana, marcado pela substância fluorescente. Após uma nova lavagem para a retirada da antiglobulina humana marcada, não fixada imunologicamente, as lâminas, são montadas e examinadas ao microscópio de fluorescência.

a) Antígeno

Como antígeno para a reação de imunofluorescência indireta, foram usados toxoplasmas da cepa M, isolada pela Dra. Maria P. Deane e que vem sendo utilizada há vários anos no Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina de São Paulo e no "Instituto de Medicina Tropical de São Paulo".

Os parasitas são obtidos por lavagem com solução salina (NaCl a 0,85%) da cavidade peritoneal de camundongos, inoculados por via peritoneal 48 horas antes. Ao líquido de lavagem adiciona-se igual volume de solução salina, contendo formalina a 2%. Coloca-se a mistura por 30 a 60 minutos a 37° e centrifuga-se em seguida por 10 minutos a 2.000 r.p.m. O sedimento é ressuspenso em volume adequado de solução salina, em concentração suficiente para fornecer cerca de 10 parasitas por campo microscópico (aum. 400 x). Gotas de suspensão de parasitas são imediatamente distribuídas em pequenas áreas delimitadas sobre lâminas e fixadas por simples dissecação em estufa a 37°C.

b) Características dos conjugados antiglobulínicos

Estes conjugados foram preparados a partir de soros imunes de coelhos, inoculados com solução de globulinas humanas obtidas por precipitação de soros com sulfato de amônio em meia saturação. As globulinas

dos soros imunes foram marcadas por isotiocianato de fluoresceína (de The Sylvana Company).

Para a reação utilizaram-se diluições do conjugado capazes de reatividade máxima na ausência de colorações inespecíficas (diluição de 1/100 e 1/200, em geral).

c) *Desenvolvimento da reação*

As lâminas eram retiradas do congelador alguns minutos antes de serem usadas e postas a secar à temperatura ambiente, sob um ventilador. Cada pequeno quadrado circunscrito na lâmina recebia 0,01 ml da diluição do soro a ser examinado. Assim cada grupo de cinco pequenos quadrados destinava-se a um soro, em cinco diluições crescentes, ou seja 1/16, 1/64, 1/256, 1/1024 e 1/4096. Os soros positivos até 1/4096 eram submetidos a nova diluição a partir de 1/4000, na razão 2. Em seguida as lâminas eram colocadas a 37°C durante uma hora, para desenvolver-se a reação. Impedia-se o ressecamento, cobrindo-se as lâminas com uma placa de Petri, revestida com papel de filtro umedecido. Após o intervalo de tempo mencionado, as lâminas eram mergulhadas durante 15 minutos em solução salina tamponada, a qual era renovada cada 5 minutos. As lâminas eram submetidas a uma secagem sumária com papel de filtro. Depositava-se em cada pequena superfície da reação 0,01 ml de uma solução contendo o conjugado, solução salina e Azul de Evans a 0,001 g%. As lâminas eram novamente postas a 37°C durante uma hora, em atmosfera úmida. Repetia-se a lavagem e a secagem da lâmina, na forma já descrita. A seguir, cobria-se a área dos pequenos quadrados com uma gota de glicerina tamponada e com uma lamínula. Evitava-se o deslizamento da lamínula, ao exame microscópico, prendendo-a com esmalte de unha em seus cantos.

As lâminas prontas para a leitura podiam ser conservadas no congelador para exame posterior. Procedíamos à leitura de imediato, utilizando um microscópio Zeiss, binocular, com objetiva de imersão 40, provido de diafragma, de oculares 10 ou 12,5x, campo escuro, com condensador cardióide. A luz era fornecida por uma lâmpada

MBO-200, filtro excitador BG 12 de 3 mm e filtro barreira nº 50 (Zeiss).

Em cada série de reações empregávamos um soro positivo de título conhecido e um negativo, nas várias diluições, como testemunhos.

As reações positivas apresentavam fluorescência dos toxoplasmas, mais evidente na periferia do parasita, onde formavam um limite brilhante, uniforme, cuja intensidade diminuía com o aumento progressivo das diluições dos soros. O título do soro era dado pela maior diluição, capaz de determinar algum grau de fluorescência nos toxoplasmas. Nas reações negativas, os parasitas apresentavam uma coloração avermelhada, tênue, dada pelo Azul de Evans, ou, por vezes, discreta fluorescência localizada em uma das extremidades.

2. *Técnica de van NUNEN & van der VEEN*

Realizada a reação de imunofluorescência descrita, os soros permaneceram guardados a - 20°C. Cêrca de um ano após escolhemos 30 amostras desses soros, para serem novamente examinados pela imunofluorescência indireta, agora com o emprego da técnica apresentada por van NUNEN & van der VEEN⁴⁹, em 1965.

As reações foram feitas no Departamento de Higiêne da Universidade Católica de Nijmegen, Holanda, sendo utilizados como antígenos cortes de cérebro de camundongos contendo toxoplasmas da cepa Deelen. Os camundongos eram inoculados com o parasita intracerebralmente, três dias após os cérebros eram removidos e congelados rapidamente a - 190°C com nitrogênio líquido e conservados a seguir a - 20°C, durante uma semana, no máximo. Cada cérebro cortado por criostato fornecia de 400 a 500 cortes de 5 µ. O corte de cérebro era colocado em lâmina e sobre sua superfície adicionava-se o soro a examinar, em diluições crescentes. Após um período de incubação para permitir a reação antígeno-anticorpo, a lâmina era lavada e recebia o conjugado contendo anticorpos antiglobulina humana e a substância fluorescente.

O conjugado era fornecido por Roboz Surgical Instruments Co. (EUA). A leitura era feita em microscópio fluorescente Zeiss.

Os toxoplasmas localizavam-se principalmente nas meninges e tecidos adjacentes. Quando no soro examinado estavam presentes anticorpos toxoplasmáticos, observava-se

fluorescência dos parasitas. O título do soro era dado pela maior diluição capaz de evidenciar fluorescência nos toxoplasmas.

O quadro VIII mostra os resultados referentes aos 30 soros examinados, em São Paulo e em Nijmegen (Holanda), pelas duas técnicas descritas.

QUADRO VIII

Resultados comparativos de 30 soros de índios do Alto Xingu, Brasil Central, examinados para a determinação de anticorpos ao T. gondii, pela técnica da imunofluorescência indireta, em São Paulo, Brasil (1966) e em Nijmegen, Holanda (1967).

Título das reações (1:)

São Paulo \ Nijmegen		Título das reações (1:)					Total
		Negativo	64	256	1024	≥ 4.000	
Título das reações (1:)	Negativo	7	—	—	—	—	7
	64	—	4	—	—	—	4
	256	—	1	—	2	—	3
	1024	—	1	2	4	—	7
	40000	—	—	2	3	1	6
	≥ 8000	—	—	—	2	1	3
Total		7	6	4	11	2	30

MÉTODO ESTATÍSTICO

Em virtude da natureza dos nossos dados, preferimos empregar testes não paramétricos. Utilizamos a decomposição do X² nos moldes preconizados por COCHRAN¹⁰ (1954), e o teste do X² em quadros de 2 x 2 (associação), usando, quando necessário, o método exato de Fisher, tendo em vista as restrições impostas por Cochran.

IV — RESULTADOS

Nas 254 amostras de soros dos índios do Alto Xingu, submetidas à reação de imunofluorescência indireta para toxoplasmose, registramos 131 soros positivos, ou seja, 51,6%, cujos títulos foram iguais ou superiores a 1:16.

a) *Resultados, segundo o sexo e o grupo etário*

Na população examinada, para um total de 130 homens, tivemos 61 reações positivas, ou seja, 46,9% e para um total de 124 mulheres, tivemos 70 reações positivas, ou seja 56,5%.

O Quadro IX e o gráfico 1, mostram a distribuição das reações positivas nos dois sexos, dentro dos grupos etários adotados (0 |— 5, 5 |— 10, 10 |—20, 20 |— 30, 30 |— 40, 40 |— 50 e 50 |— 60 anos), atribuindo-se a cada classe um símbolo para facilitar o trabalho posterior. As proporções foram expressas com 6 casas decimais tendo em vista o método analítico a ser usado.

QUADRO IX

Proporção de reações sorológicas positivas, pela técnica da imunofluorescência indireta, segundo o sexo e os grupos etários, em índios do Alto Xingu, Brasil Central, 1966.

Grupo etário (anos)	M a s c u l i n o					F e m i n i n o				
	Positivo	Negativo	Total	Proporção(+) (P)	Símbolo	Positivo	Negativo	Total	Proporção(+) (P)	Símbolo
0 - 5	5	13	18	0,277777	T ₁	9	16	25	0,360000	T ₂
5 - 10	8	13	21	0,380952	T ₃	7	10	17	0,411764	T ₄
10 - 20	15	11	26	0,576923	T ₅	14	9	23	0,608695	T ₆
20 - 30	13	14	27	0,481481	T ₇	12	10	22	0,545454	T ₈
30 - 40	12	14	26	0,461538	T ₉	20	6	26	0,769230	T ₁₀
40 - 50	6	2	8	0,750000	T ₁₁	4	3	7	0,571428	T ₁₂
50 - 60	2	2	4	0,500000	T ₁₃	4	0	4	1,000000	T ₁₄
Total	61	69	130	0,469230		70	54	124	0,564516	

$$X^2 = 22,762198 *$$

$$X^2_{13GL-0,05} = 22,36$$

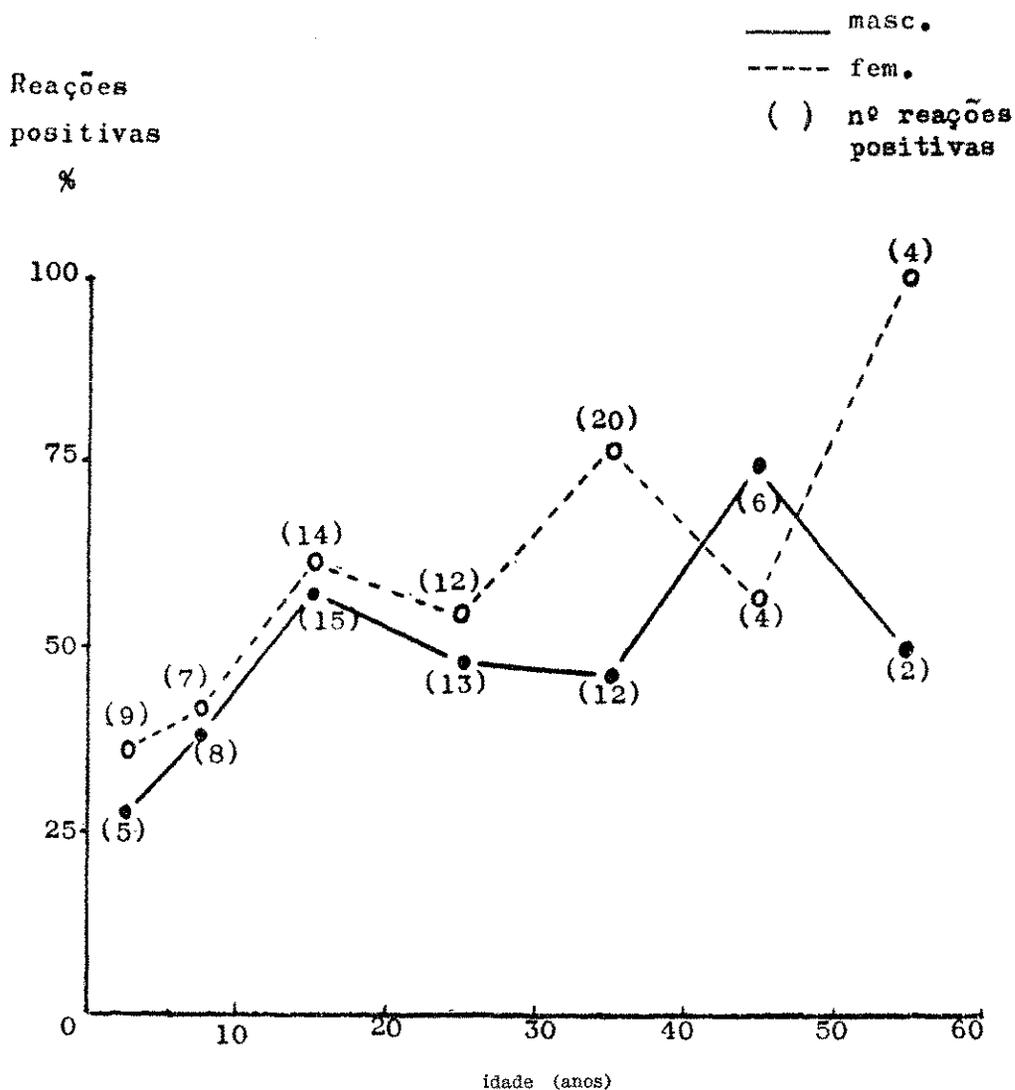


Gráfico 1 — Distribuição percentual das reações sorológicas positivas para toxoplasmose, segundo o sexo e os grupos etários, entre índios do Alto Xingu, Brasil Central, 1966.

QUADRO X

Decomposição de X^2 para as reações sorológicas positivas, segundo os sexos e os grupos etários em índios do Alto Xingu, Brasil Central, 1966.

C o m p o n e n t e s	G.L.	X^2	X^2_c
$(T_1+T_2+T_3+T_4) \times (T_5+T_6+T_7+T_8+T_9+T_{10}+T_{11}+T_{12}+T_{13}+T_{14})$	1	11,845342 ***	
$(T_1+T_3) \times (T_2+T_4)$	1	0,183643	0,199550
$T_1 \times T_3$	1	0,413097	0,464274
$T_2 \times T_4$	<u>1</u>	<u>0,108571</u>	<u>0,114982</u>
$(T_1+T_2 + T_3+T_4)$	3	0,705311	0,766409
$(T_5+T_7+T_9+T_{11}+T_{13}) \times (T_6+T_8+T_{10}+T_{12}+T_{14})$	1	2,966582	3,061965
$(T_5+T_7+T_9) \times (T_{11}+T_{13})$	1	1,072391	1,074573
$(T_5 + T_7) \times T_9$	1	0,311204	0,310946
$T_5 \times T_7$	1	0,483159	0,484231
$T_{11} \times T_{13}$	1	0,667352	0,750024
$(T_6+T_8+T_{10}) \times (T_{12}+T_{14})$	1	0,240375	0,266976
$(T_6+T_8) \times T_{10}$	1	2,418399	2,647624
$T_6 \times T_8$	1	0,180082	0,184365
$T_{12} \times T_{14}$	1	1,872001	2,357161
$(T_5+T_6+T_7+T_8+T_9+T_{10}+T_{11}+T_{12}+T_{13}+T_{14})$	9	10,211545	10,539872
T o t a l	13	22,762198 *	

Para estudarmos o comportamento das reações positivas em relação ao sexo e aos grupos etários, adotamos a decomposição aditiva do X^2 , nos moldes preconizados por COCHRAN¹⁰ (1954). Nossa hipótese de nulidade é de que as proporções de reações positivas, nos dois sexos e nos diversos grupos etários, são iguais. A hipótese alternativa estabelecida é a de que tais proporções são diferentes; não dispomos de razões teóricas para atribuir previamente um determinado sentido a essa diferença. Adotamos 0,05 como nível de rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com um asterisco (*) os valores de X^2 que ultrapassam o nível crítico correspondente ao número de graus de liberdade para cada caso.

Com o valor encontrado para X^2 , a hipótese de nulidade para a igualdade de proporções de reações positivas em todas as classes, não pode ser aceita. Passamos, então, à decomposição do valor do X^2 , segundo Cochran. A inspeção dos valores de P leva-nos à formação de dois grupos, o primeiro com indivíduos do sexo masculino e feminino pertencentes aos grupos etários de 0 |— 5 e 5 |— 10 anos, e o segundo com os indivíduos de 10 |— 60 anos. Os valores obtidos, por esta decomposição do X^2 encontram-se no quadro X, onde também figuram os valores do X^2 , não aditivos, obtidos adotando-se como valor esperado não a proporção no total geral de casos, mas a referente ao total dos casos nas classes confrontadas. Verificamos, então, que os dois grupos que foram formados diferem significativamente.

$(X^2_{IGL-0,05} = 3,84, X^2_{calculado} = 11,845342)$ ou seja, o grupo etário de 0 |— 10 anos difere significativamente do grupo de |— 60 anos.

Os demais resultados que figuram no quadro X permitem verificar que, no grupo 0 |— 10 anos a hipótese de nulidade não pode ser rejeitada, quer para a diferença entre os sexos, quer para as diferenças entre idades, em cada sexo. Da mesma forma do grupo de 10 |— 60 anos, essa hipótese não pode ser rejeitada para a diferença entre os sexos e para as diferenças entre idades, em cada sexo.

b) *Resultados, segundo o título das reações*

Passamos, em seguida, à análise dos resultados do Alto Xingu, segundo o título das reações sorológicas. O quadro XI e o gráfico 2 mostram a distribuição dos 254 soros examinados, segundo o título das reações, considerando-se como positivos os soros que apresentaram título igual ou superior a 1:16, e como negativos os demais. No total de soros examinados, temos 131 positivos e 123 negativos.

QUADRO XI

Reações sorológicas para toxoplasmose, pela técnica da imunofluorescência indireta, segundo o título das reações, entre índios do Alto Xingu, Brasil Central, 1966.

Títulos da reação (1:)	Soros examinados	
	N.º	%
< 16	123	48,4
16	25	9,8
64	23	9,1
256	39	15,4
1024	29	11,4
4,000	9	3,5
8,000	4	1,6
16,000	1	0,4
32,000	1	0,4
Total	254	100,0

c) *Resultados, segundo o grupo etário e o título das reações*

No quadro XII são apresentados os resultados observados no Alto Xingu, segundo o grupo etário e o título das reações. Foram reunidos, face aos resultados anteriormente obtidos, os dados referentes aos dois sexos, em cada grupo etário.

Número de
reações

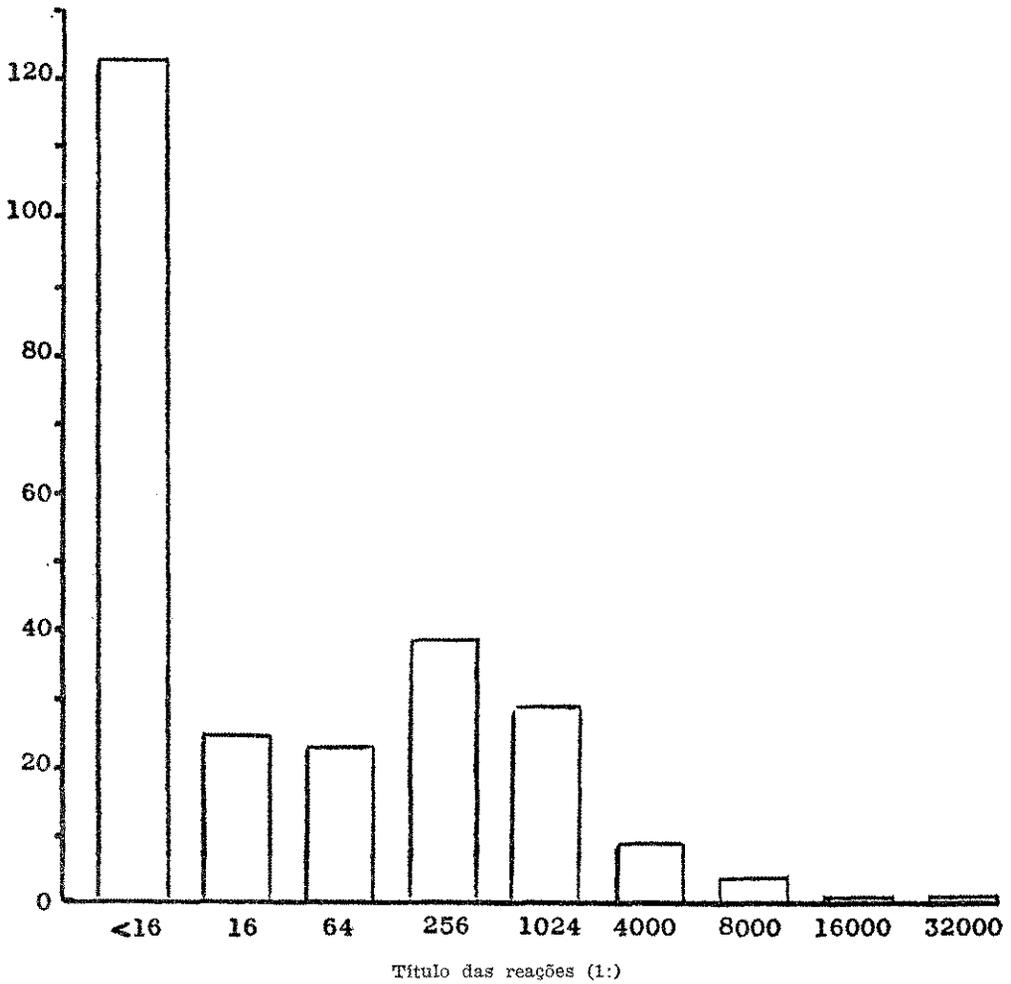


Gráfico 2 — Reações sorológicas para toxoplasmose, pela técnica da imunofluorescência indireta, segundo o título das reações, entre índios do Alto Xingu, Brasil Central, 1966.

QUADRO XII

Reações sorológicas positivas para toxoplasmose, pela técnica da imunofluorescência indireta, segundo os grupos etários e os títulos das reações, entre os índios do Alto Xingu, Brasil Central, 1966 .

Grupo etário (anos)	Soros examinados	Título das reações (1:)								Reações positivas	
		16	64	256	1024	4000	8000	16000	32000	N.º	%
0 — 5	43	2	5	3	1	1	1	—	1	14	32,6
5 — 10	38	5	2	2	3	2	—	1	—	15	39,5
10 — 20	49	8	6	6	5	2	2	—	—	29	39,5
20 — 30	49	7	2	9	7	—	—	—	—	25	51,0
30 — 40	52	2	4	13	9	3	1	—	—	32	61,5
40 — 50	15	—	3	3	4	—	—	—	—	10	66,7
50 — 60	8	1	1	3	—	1	—	—	—	6	75,0
Total	254	25	23	39	29	9	4	1	1	131	51,6

Como fato digno de interesse, observamos que, nos indivíduos dos grupos etários mais idosos, há uma maior proporção das reações de títulos 1:256 e 1:1024, do que nos mais jovens. A partir desta observação, propomos-nos analisar se as reações de títulos baixos (1:16 e 1:64), de títulos médios (1:256 e 1:1024) e de títulos altos (1:4 000 em diante) estão presentes, nas

mesmas proporções, na população de 0 |— 20 anos e de 20 |— 60 anos, ou se há uma diferença significativa, do ponto de vista estatístico, nessa distribuição.

O quadro XIII e os gráficos 3a e 3b mostram a distribuição das reações positivas, segundo os títulos das mesmas, nas

QUADRO XIII

Proporção de reações sorológicas positivas, pela técnica da imunofluorescência indireta, segundo os títulos de reações e grupos etários, em índios do Alto Xingu, Brasil Central, 1966

Símbolo	Título das reações	Indivíduos examinados			P (0 — 20)
		0 — 20	20 — 60	Total	
T ₁	16	15	10	25	0,600000
T ₂	64	13	10	23	0,565217
T ₃	256	11	28	39	0,282051
T ₄	1024	9	20	29	0,310344
T ₅	≥ 4000	10	5	15	0,666666
	Total	58	73	131	0,442748

$$X^2 = 13,094712^* \quad X^2_{4GL-0,05} = 9,49$$

duas populações consideradas. Na análise estatística dos dados desse quadro, usamos igualmente a decomposição do X² segundo COCHRAN¹⁰. Em função dos valores de P, reunimos os títulos das reações em dois grupos, o primeiro compreendendo os títulos 1:256 e 1:1024 e o segundo, os demais títulos. A decomposição do X² é apresentada no quadro XIV.

A análise estatística mostra diferença significativa entre os dois grupos formados

$$(X^2_{IGL-0,05} = 3,84, \quad X^2_{calculado} = 12,660273).$$

Há assim, maior proporção de reações de títulos médios ou seja 1:256 e 1:1024, nos indivíduos de 20 |— 60 anos, e portanto maior proporção de reações de títulos baixos (1:16 e 1:164) e de títulos altos (1:4000 em diante) nos indivíduos de 0 |— 20 anos.

Gráfico 3a

Número de reações positivas

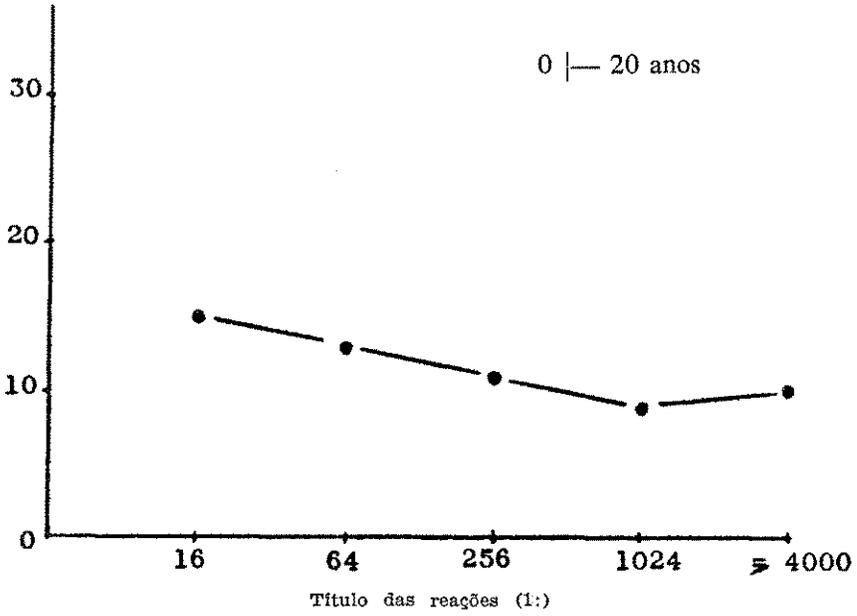
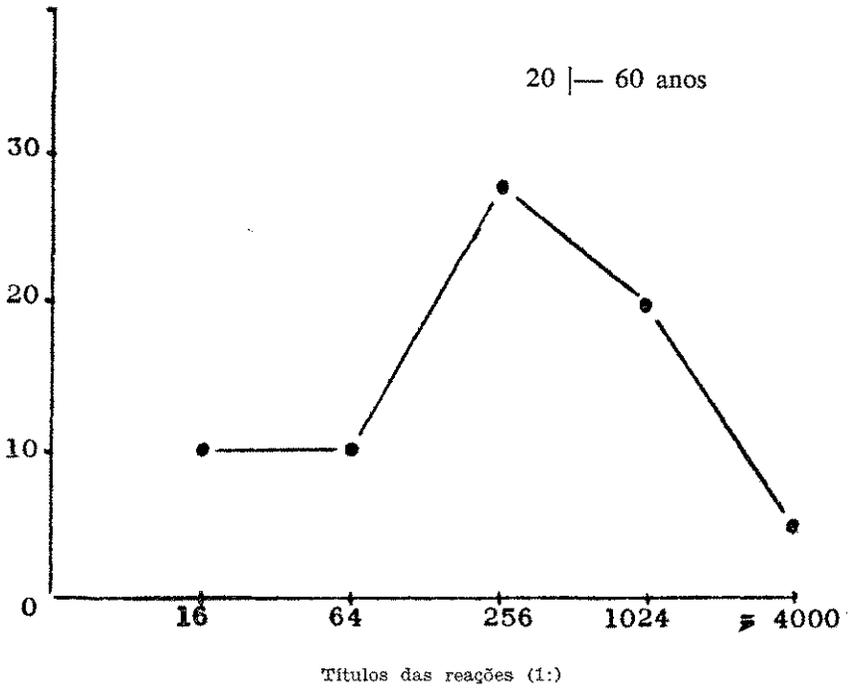


Gráfico 3b



Gráficos 3a e 3b — Reações sorológicas para toxoplasmose, segundo o título das reações, nos grupos etários de 0 a 20 anos (gráfico 3a) e de 20 a 60 anos (gráfico 3b), entre índios do Alto Xingu, Brasil Central, 1966.

QUADRO XIV

Decomposição de X^2 para as reações sorológicas positivas, segundo os títulos das reações e grupos étnicos, em índios do Alto Xingu, Brasil Central, 1966.

Componentes	Graus de liberdade	X^2	X^2_c
$(T_3+T_4) \times (T_1+T_2+T_5)$	1	12,660273***	0,064143
$T_3 \times T_4$	1	0,053975	0,064143
$(T_3 + T_4)$	1	0,053975	0,064143
$(T_1+T_2) \times T_5$	1	0,321706	0,331607
$T_1 \times T_2$	1	0,058758	0,059644
$(T_1 + T_2 + T_5)$	2	0,380464	0,392174
T o t a l	4	13,094712**	

V — COMENTÁRIOS

O estudo da prevalência da infecção pelo *T. gondii* no homem e nos animais, baseia-se fundamentalmente na pesquisa dos anticorpos séricos. No entanto, apesar da existência de diversas técnicas laboratoriais para a identificação de anticorpos ao toxoplasma, não contamos ainda com uma reação ideal, perfeitamente padronizada, de fácil execução, acessível a grande número de laboratórios em todo o mundo.

No presente inquérito utilizamos a reação de imunofluorescência indireta, introduzida recentemente, (KELEN *et alii*³⁹, 1962), que apresenta algumas vantagens em relação às técnicas anteriores.

As primeiras observações sobre o emprego das técnicas de imunofluorescência na toxoplasmose, foram feitas por GOLDMAN³² (1957). A partir de um soro positivo à reação de Sabin-Feldman, de título 1:4000, marcado pelo isocianato de fluoresceína, pôs em evidência a presença de toxoplasmas por fluorescência, quando observados à luz violeta, em esfregaços obtidos do exudato peritoneal de camundongos previamente infectados por via peritoneal. Demonstrou, ainda, a possibilidade de ser bloqueada a reação, por expo-

sição prévia do antígeno a um soro não marcado, contendo anticorpos toxoplasmáticos. A seguir GOLDMAN³³, (1957), aplicou esta técnica de inibição da fluorescência à pesquisa de anticorpos séricos, tratando os esfregaços contendo toxoplasmas pelos soros suspeitos e pelas globulinas específicas marcadas. A presença de anticorpos ao parasita, nos soros examinados, era evidenciada pela inibição total ou parcial da fluorescência dos toxoplasmas.

KELEN *et alii*³⁹, em 1962, empregaram a técnica da imunofluorescência indireta para a pesquisa de anticorpos ao *T. gondii*. Examinaram 617 soros humanos pelas reações de imunofluorescência indireta, Sabin-Feldman, fixação do complemento e hemaglutinação. Enquanto 30,8% dos soros foram positivos ao teste de Sabin-Feldman, nas demais reações os resultados foram nitidamente inferiores: 5% para a imunofluorescência indireta, 2,9% para a fixação do complemento e 3,9% para a hemaglutinação. A principal discordância entre as reações de imunofluorescência indireta e de Sabin-Feldman registrou-se nos soros com títulos de 1:64 ou inferior.

GARIN & AMBROISE-THOMAS²⁸, em 1963, examinaram 189 soros pela imunofluorescência indireta e pela reação de lise,

esta última uma modificação do teste de Sabin-Feldman. Os soros foram testados nas seguintes diluições: 1:10, 1:100 ou 1:200 e 1:1000. Registraram boa correlação entre os resultados, sendo que pela imunofluorescência alguns soros mostraram títulos mais elevados, correspondentes a uma diluição.

CAMARGO⁵, em 1964, trabalhando com 1000 soros humanos, comparou os resultados obtidos através das reações de imunofluorescência indireta e Sabin-Feldman, considerando-os positivos a partir da diluição 1:16. Obteve 225 soros negativos e 768 positivos em ambas as reações. Somente 7 soros foram negativos no teste de Sabin-Feldman e positivos na imunofluorescência, (título 1:16). Considerando os resultados quantitativamente, houve concordância dos títulos ou variação de uma diluição em 97,7% dos soros positivos e diferença de duas diluições nos 2,3% restantes.

FULTON & VOLLER²⁷, em 1964, examinaram 20 soros pelas reações de imunofluorescência indireta, Sabin-Feldman, aglutinação direta e fixação do complemento. Obtiveram boa correlação entre os resultados destas diferentes reações, menos evidente com a fixação do complemento.

Van NUNEN & van der VEEN⁴⁹, em 1965, preconizaram na imunofluorescência indireta, o emprego de cortes congelados de cérebros de camundongos, previamente inoculados com suspensão de *T. gondii* intracerebralmente. No exame de 341 soros humanos observaram que os resultados da reação de imunofluorescência indireta concordavam com os da reação de Sabin-Feldman ou os títulos eram ligeiramente inferiores. Em coelhos infectados experimentalmente com toxoplasmas, encontraram concordância no tempo de aparecimento dos anticorpos séricos e na elevação do título, em ambas as reações.

WALTON *et alii*⁶⁵, em 1966, examinaram 1000 soros recebidos do Panamá e Bolívia, pelas reações de imunofluorescência indireta e Sabin-Feldman, a partir da diluição 1:8 e na razão 2, com os seguintes resultados:

negativos nas duas reações	500
positivos nas duas reações	475
positivos na IFI e negativos ao SF	25
negativos na IFI e positivos ao SF	0

Dos 475 soros positivos, 331 apresentaram em ambas as reações o mesmo título ou diferença de duas diluições, e 17 soros apresentaram diferenças superiores a duas diluições.

A especialidade da reação de imunofluorescência indireta na pesquisa de anticorpos séricos ao *T. gondii* foi posta em evidência por FULTON & VOLLER²⁷, em 1964 e FLETCHER²⁸, em 1965. Determinaram a especificidade da reação através de testes de absorção e da verificação da ausência de reações cruzadas com soros de doentes acometidos de malária, tripanosomíase africana, filariose, leishmaniose visceral e cutânea, leptospirose, salmonelose e sífilis, além de um indivíduo infectado com *Sarcocystis*.

Em conclusão, pode-se afirmar que a imunofluorescência indireta na toxoplasmose constitui uma reação específica e sensível, cujos resultados, graças ao aperfeiçoamento de sua técnica, são comparáveis aos obtidos pela reação de Sabin-Feldman. Esta constatação merece destaque, pois a reação de Sabin-Feldman permanece como a reação padrão para a avaliação dos novos testes sorológicos, propostos para o estudo da toxoplasmose.

A imunofluorescência indireta apresenta, em relação ao teste de Sabin-Feldman, algumas vantagens:

1 — reduz em muito o manuseio com toxoplasmas vivos;

2 — dispensa a presença do fator acessório, encontrado no sangue fresco de determinados indivíduos e sempre difícil de ser obtido e conservado;

3 — permite maior rapidez na leitura da reação;

4 — trata-se de uma reação de fácil padronização, sendo que a distribuição do antígeno e do conjugado pode ser feita a partir de um laboratório central para cen-

tros menores. Destacando êste fato, FLETCHER, afirma: "In this way uniform results of great value in epidemiological work could be obtained by peripheral laboratories scattered over a very wide area".

Consideramos justificada não só a adoção do teste de imunofluorescência indireta, no presente inquérito, assim como o confronto dos seus resultados com aqueles obtidos por vários autores, utilizando a reação de Sabin-Feldman.

Com o intuito de verificarmos o comportamento dos soros por nós examinados e testarmos a técnica laboratorial utilizada, 30 amostras de soros que figuram no presente inquérito foram reexaminados cerca de um ano após, em Nijmegen, Holanda, graças à gentileza da Dra. van Nunen. Foi empregada a reação de imunofluorescência indireta, tendo como antígeno toxoplasmas da cepa Deelen, presentes em cortes de cérebro de camundongos, segundo técnica descrita anteriormente.

Conforme se comprova pelo quadro VIII, houve concordância no total de reações positivas (23) e negativas (7). Dos soros positivos, 18 apresentaram o mesmo título ou variação de uma diluição, na razão 4, e os soros restantes em número de 5, apresentaram diferença de duas diluições. Dentro das diferenças assinaladas, as reações realizadas em Nijmegen tiveram em geral título menor.

A concordância observada pode-se considerar satisfatória, em relação aos dados da literatura (CAMARGO⁵, 1964; van NUNEN⁴⁹, 1965), tendo-se em conta as diferenças de técnicas entre as duas reações, o emprêgo de toxoplasmas de outra cepa, o uso de conjugados de procedência diversa e o intervalo de tempo transcorrido.

Nosso empenho em estudar alguns aspectos epidemiológicos da toxoplasmose no Parque Nacional do Xingu, data de 1965, quando tivemos o primeiro contato com seus habitantes. Naquela oportunidade participamos de um inquérito sorológico sumário (BARUZZI & AMATO¹, 1965), pela reação de Sabin-Feldman, em 92 índios (38,04% de positivos).

Aquêle trabalho inicial e o melhor conhecimento das tribos indígenas da região, levaram-nos à realização de um estudo mais amplo, através do presente inquérito. Em seu planejamento procuramos escolher uma amostra representativa da população do Alto Xingu, no entanto, encontramos algumas dificuldades. Não conseguimos obter nenhum dado informativo sobre a sua distribuição por grupo familiar, sexo e idade, e, nossas possibilidades de comunicação com os habitantes da região eram limitadas pelo desconhecimento das linguas indígenas. As informações fornecidas pelos índios, que falavam nosso idioma, eram em geral muito precárias, mesmo em resposta a indagações simples, como o número de moradores de uma oca ou a constituição de uma família.

Resolvemos, então, realizar o inquérito sobre toxoplasmose paralelamente ao levantamento da população indígena executado pelas equipes do Instituto de Medicina Preventiva da Escola Paulista de Medicina sob nossa orientação, em julho e setembro de 1966.

Os indígenas ao comparecerem ao local de trabalho da equipe médico-odontológica, eram identificados, submetidos a exame físico e exame odontológico, e retirava-se uma amostra de sangue venoso para investigações sorológicas. O comparecimento fazia-se por grupos familiares, o que vinha facilitar nossa tentativa em determinar os laços de parentesco entre os indivíduos examinados, e a seguir a estrutura tribal. Em visitas realizadas às aldeias procurava-se completar o levantamento dos faltosos, dentro dos grupos familiares correspondentes. Os índios doentes que vinham solicitar assistência médica, eram atendidos por um membro da equipe, encarregado do atendimento clínico e somente eram incluídos no recenseamento geral da população, por ocasião do exame dos seus grupos familiares.

Consideramos justificado o critério por nós adotado, que permitiu a inclusão no inquérito sorológico sobre a ocorrência de anticorpos ao *T. gondii*, de 254 índios, que representavam cerca de 2/5 da população do Alto Xingu.

Pode-se considerar satisfatória, a distribuição por sexo e grupo etário da população incluída no presente inquérito. O

número de indivíduos dos dois sexos é aproximadamente o mesmo (130 homens e 124 mulheres), como seria de se esperar, na ausência de um fator mórbido conhecido, que atuasse preferentemente sobre um dos sexos.

No levantamento de um grupo humano primitivo é prevista uma certa margem de erro, entre a idade avaliada e a idade real. Procuramos não ultrapassar essa margem de erro, recorrendo ao auxílio da ficha odontológica e adotando, a partir dos 10 anos, a divisão dos indivíduos examinados por grupos etários maiores.

Em nosso trabalho observamos, uma redução acentuada no número de indivíduos examinados, com idade superior a 40 anos. Assim, para um total de 254 índios, tivemos apenas 23 no grupo de 40 — 60 anos e nenhum no grupo etário que viria a seguir. Este fato foi confirmado nas visitas feitas às aldeias e também durante o preenchimento da ficha utilizada no levantamento da população. A maioria dos indivíduos, de 25 a 35 anos de idade, quando interrogados informavam que um dos progenitores ou ambos já haviam falecido.

Não temos elementos suficientes para explicar a pirâmide de idade dos índios do Alto Xingu. Desconhecemos quais são as causas de morte mais frequentes nesta população. Esperamos que, com o progredir dos trabalhos que vêm sendo realizados pela Escola Paulista de Medicina, encontrem-se respostas exatas a estas indagações.

O inquérito sorológico sobre a toxoplasmose, por nós efetuado, revelou 51,6% de reações positivas, em 254 índios examinados, a partir do título 1:16. Para uma avaliação deste resultado, apresentaremos alguns inquéritos realizados por vários autores, em diferentes populações americanas.

FELDMAN & MILLER, em 1956, estudaram 10 grupos humanos através da reação de Sabin-Feldman, a partir da diluição 1:16. Incluíram indivíduos dos dois sexos de diferentes idades, em aparente bom estado de saúde.

População	Soros examinados	
	Número	Porcentagem de positivos %
Esquimó	21	0
Índios Navajos	236	4
Islandia	108	11
Portland, EUA	293	17
St. Louis, EUA	184	26
New Orleans, EUA	270	31
Pittsburgh, EUA	144	35
Haiti	104	36
Honduras	266	64
Tahiti	121	68

GIBSON *et alii*²⁹, em 1956, entre 987 indivíduos da raça negra, habitantes da zona rural, em Tennessee, E. U. A., encontraram 21,8% de positivos pela reação de Sabin-Feldman, a partir de 1:16.

GIBSON & COLEMAN³⁰, em 1958, examinaram 100 soros provenientes da Guatemala, pertencentes a indivíduos de descendência maia, maiores de 16 anos de idade, que habitavam uma propriedade agrícola próxima da costa do Pacífico. Encontraram 94% das reações positivas. Em Costa Rica, no exame de 156 indivíduos maiores de 20 anos, observaram 88,5% de reações positivas. Em ambos os inquéritos usaram a reação de Sabin-Feldman, a partir do título 1:4.

LUNDE & JACOBS⁴¹, em 1958, em Trinidad, através das reações de Sabin-Feldman e de hemaglutinação, tiveram 54,4% de positivos, a partir da diluição 1:16, em 121 indivíduos examinados.

MORALES *et alii*⁴⁰, em 1961, na ilha de Pascoa, situada a 4.800km da costa chilena e habitada por 1.180 pessoas, examinaram os soros de 63 indivíduos, cujas idades variavam de 11 a 75 anos. Registraram 92% de reações positivas a partir de 1:16. Os resultados foram confirmados pela reação de hemaglutinação.

DELASCIO¹⁷, em 1956, na cidade de São Paulo, observou entre gestantes normais, 42% de reações positivas pela reação de Sabin-Feldman, com títulos de 1:4 a 1:256.

NUSSENZWEIG⁵⁰, em 1957, também na cidade de São Paulo, registrou 71,2% de reações positivas, entre 334 doadores de sangue. Empregou a reação de Sabin-Feldman, a partir da diluição 1:16.

DEANE *et alii*¹⁵, em 1963, no Território do Amapá, tiveram 68,1% de reações positivas em 334 indivíduos maiores de 10 anos, utilizando a reação de Sabin-Feldman com o título inicial 1:16.

JAMRA³⁸, em 1964, realizou um inquérito entre 300 habitantes da uma área previamente delimitada, nos subdistritos do Jardim América e Vila Madalena, na cidade de São Paulo. A reação de Sabin-Feldman, mostrou 67% de positivos, a partir do título 1:16.

Os trabalhos apresentados, mostram que entre as populações estudadas, há uma ampla variação na percentagem de indivíduos com reações positivas. Assim, entre os esquimós, índios Navajos (Arizona, E.U.A.) e habitantes de Tenessee (E.U.A.), foram registrados, respectivamente, 0%, 4% e 21,8% de positivos, contra 88,5% em Costa Rica, 92% na ilha de Páscoa e 94% na Guatemala.

As diferenças são indubitavelmente grandes, mesmo se considerarmos que alguns dos inquéritos citados incluem grupos etários diferentes e que as pirâmides de idade dos indivíduos examinados não são iguais.

Procuramos confrontar os nossos resultados, com aqueles obtidos em dois outros inquéritos realizados no Brasil. O primeiro efetuado por DEANE *et alii*¹⁵ (1963), no extremo norte do país, no Território do Amapá, em uma população aparentemente radicada na região desde o nascimento, vivendo em pequenos núcleos populacionais, e o segundo, realizado por JAMRA³⁸ (1964.), entre habitantes de uma área residencial da cidade de São Paulo. Nos três levantamentos sorológicos citados, foram usados, como antígenos, toxoplasmas

da cepa M e as reações foram consideradas como positivas a partir do título 1:16.

No Alto Xingu, ao estudarmos a distribuição das reações positivas nos dois sexos, registramos 46,9% de reações positivas entre os homens e 65,5% de reações positivas entre as mulheres. A análise estatística utilizada não mostrou diferença significativa na proporção de reações positivas entre os sexos, nos diferentes grupos etários.

DEANE *et alii*¹⁵, (1963), no Amapá, examinando 118 homens e 236 mulheres, encontraram, respectivamente, 71,2% e 66,5% de reações positivas.

JAMRA³⁸ (1964), em 300 habitantes de São Paulo (119 homens e 181 mulheres), registrou 63% de reações positivas no sexo masculino e 69,6% no sexo feminino. A análise estatística utilizada, no referido trabalho, não mostrou diferença significativa entre os dois sexos, na proporção de reações positivas nos diferentes grupos etários.

Por estes resultados, pode-se presumir que não há predominância de reações sorológicas positivas para toxoplasmose em nenhum dos sexos e que as diferenças, eventualmente registradas traduzem variações ocasionais. Esta impressão é reforçada pelo trabalho de FELDMAN & MILLER²² (1956), que no exame de 1.191 indivíduos (548 homens e 643 mulheres), pertencentes a seis grupos populacionais diferentes, encontraram 36% de reações positivas no sexo masculino e 36% no sexo feminino. No entanto, no exame isolado de cada uma dessas populações, observaram ligeira predominância das reações positivas, ora entre os homens, ora entre as mulheres.

Os levantamentos sorológicos efetuados, por nós, no Alto Xingu, por DEANE *et alii*¹⁵ (1963), no Amapá e por JAMRA³⁸ (1964), em São Paulo, permitem estabelecer uma comparação entre os resultados observados, dentro de cada grupo etário, nas três populações estudadas. Isto é, entre crianças, jovens e adultos, incluídos nos inquéritos citados. Os dados respectivos são apresentados nos quadros XV, XVI e XVII e no gráfico 4.

QUADRO XV

Reações sorológicas positivas para toxoplasmose, em índios do Alto Xingu, 1966.

Grupos etários	Indivíduos examinados	Reações positivas	
		N.º	%
0 — 5	43	14	32,6
5 — 10	38	15	39,5
10 — 20	49	29	59,5
20 — 30	49	25	51,0
30 — 40	52	32	61,5
40 — 50	15	10	66,7
50 — 60	8	6	75,0
Total	254	131	51,6

QUADRO XVI

Reações sorológicas positivas para toxoplasmose, em habitantes do Amapá

DEANE et alii¹⁵, 1963

Grupos etários	Indivíduos examinados	Reações positivas	
		N.º	%
10 — 20	112	61	54,5
20 — 30	117	81	69,2
30 — 40	64	53	82,8
40 — 50	22	15	68,2
50 — 60	24	17	70,8
60 — ou mais	15	14	93,3
Total	354	241	68,1

QUADRO XVII

Reações sorológicas positivas para toxoplasmose, em habitantes de São Paulo (JAMRA³⁸, 1964).

Grupos etários	Indivíduos examinados	Reações positivas	
		N.º	%
0 — 5	18	2	11,1
5 — 10	20	5	25,0
10 — 20	53	21	39,6
20 — 30	56	43	76,7
30 — 40	67	53	79,1
40 — 50	41	34	82,9
50 — 60	13	12	92,3
60 — ou mais	32	31	96,6
Total	300	201	67,0

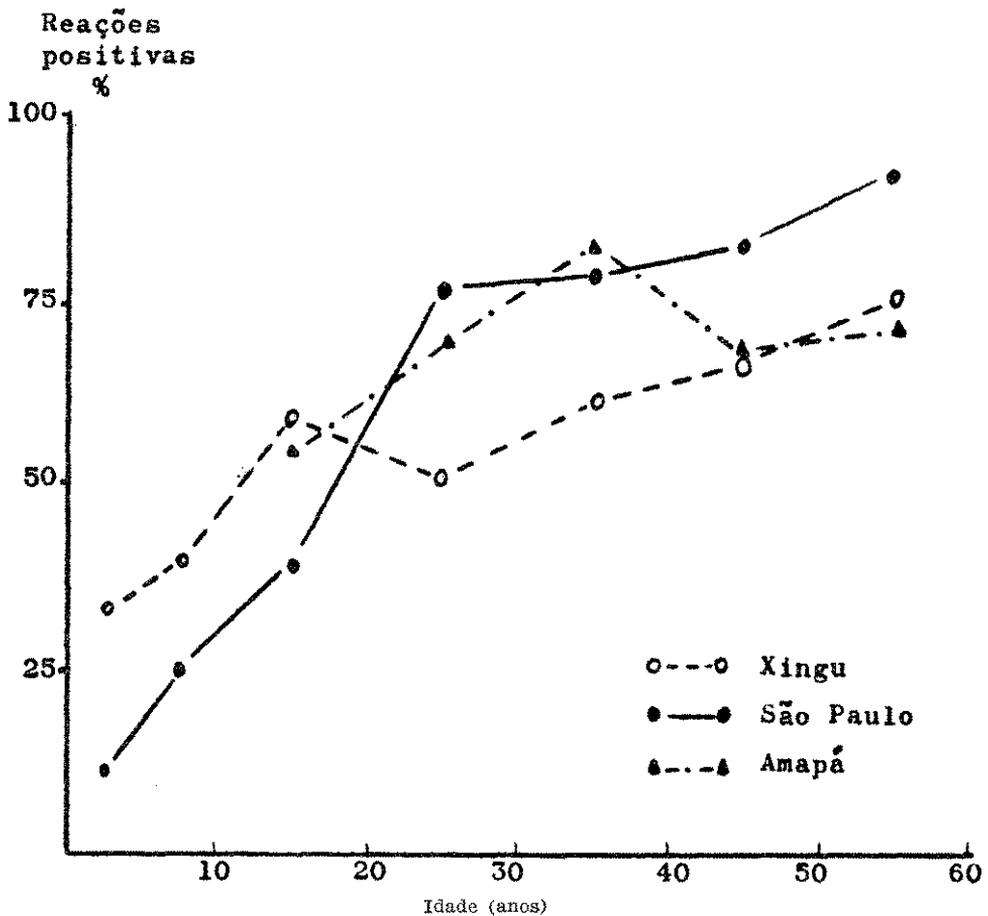


Gráfico 4 — Distribuição percentual das reações sorológicas positivas para toxoplasmose, segundo os grupos etários, registradas no Alto Xingu (1966), Amapá (DEANE et alii¹⁶, 1963) e em São Paulo (JAMRA³⁸, 1964)

Inicialmente comparamos nossos resultados com os registrados no Amapá (DEANE *et alii*¹⁵ 1963), em cada um dos grupos etários seguintes: 10 |— 20, 20 |— 30, 30 |—30, 40 |— 50 e 50 |— 60 anos. Para a análise estatística usamos o teste do X^2 em quadros de 2×2 (associação), empregando quando necessário o método exato de Fisher, tendo em vista as restrições impostas por COCHRAN¹⁰.

A análise estatística permite-nos rejeitar a hipótese de igualdade, na proporção de reações positivas nos grupos etários de 20 |— 30 anos

$$(X_{IGL-0,05}^2 = 3,83, X_{calculado}^2 = 4,2045)$$

e nos grupos etários de 30 |— 40 anos

$$(X_{IGL-0,05}^2 = 3,84, X_{calculado}^2 = 5,588).$$

Nos demais grupos etários não há significância para o valor X^2 calculado. Assim, a menor proporção de reações positivas observadas no Alto Xingu em relação ao Amapá, é significativa tanto para o grupo de 20 |— 30 anos, como para o de 30 |— 40 anos.

O mesmo estudo comparativo foi feito entre o Alto Xingu e São Paulo (JAMRA³⁸, 1964), nos grupos etários compreendidos entre 0 |— 60 anos. Encontramos diferença significativa, apenas, no grupo etário de 20 |— 30 anos

$$(X_{IGL-0,05}^2 = 3,84, X_{calculado}^2 = 6,5150),$$

com uma menor proporção de reações positivas entre os índios. Nos demais grupos etários as diferenças não são significantes.

Interessa-nos, também, verificar qual o comportamento das reações positivas, segundo o título das reações. Constata-se, que 1:256 foi o título mais freqüente no inquérito do Alto Xingu, o mesmo ocorrendo no Amapá (DEANE¹⁵, 1963) e em São Paulo (JAMRA³⁸, 1964), representando, respectivamente, 29,8%, 34,4% e 34,8% do total de reações positivas. As quatro primeiras diluições (títulos de 1:16 a 1:1024), englobam 88,5% das reações positivas do Alto Xingu, 83,4% do Amapá e 92% de São Paulo. O título mais alto, verificado no Alto Xingu e em São Paulo foi 1:32:000 e no Amapá 1:64.000.

No Alto Xingu estudamos a proporção de reações sorológicas, segundo o título das reações, na população de 0 |— 20 e 20 |— 60 anos. Verificamos que as reações de intensidade média (títulos 1:256 e 1:1024), estão presentes numa proporção significativamente maior no grupo de 20 |— 60 anos, e que tanto as reações de títulos baixo (1:16 e 1:64), como as de títulos altos (1:4 000 em diante), são mais freqüentes no grupo de 0 |— 20 anos.

Consideramos, que o comportamento diverso das reações sorológicas, com relação ao título, em jovens e adultos, observado no Alto Xingu, deverá ser investigado em outras populações, pois, talvez possa sugerir hipóteses para explicar certas peculiaridades da epidemiologia da toxoplasmose, e mesmo de sua patologia.

O presente trabalho, nos permite concluir que, a prevalência de anticorpos ao toxoplasma numa população isolada, homogênea do ponto de vista étnico e de hábitos e costumes identificáveis àqueles dos homens primitivos, não difere substancialmente, quer daquela observada em uma população de um grande centro civilizado, quer daquela verificada em pequenos núcleos populacionais da região amazônica. Este achado nos induz a inferir que a disseminação da toxoplasmose não é influenciada por hábitos civilizados.

VI — CONCLUSÕES

1. A validade dos nossos resultados, pela técnica da imunofluorescência indireta, foi confirmada em um lote de 30 soros, reexaminados cerca de um ano após, no Departamento de Higiene da Universidade Católica de Nijmegen, Holanda.

2. Em 254 índios do Alto Xingu, Brasil Central, registramos 131 reações positivas, ou seja, 51,6% a partir do título 1:16.

3. Não observamos diferença significativa, do ponto de vista estatístico, na proporção em cada grupo etário, de reações positivas nos dois sexos.

4. Observamos uma proporção significante menor de reações positivas no grupo 0 |— 10 anos, em relação ao grupo de 10 |— 60 anos.

5. Comparamos a proporção de reações positivas no Alto Xingu, com as registradas no Amapá (DEANE *et alii*¹⁵, 1963) e em São Paulo (JAMRA³⁸, 1964), entre indivíduos dos mesmos grupos etários. Observamos no Alto Xingu, em relação ao Amapá, uma proporção significativamente menor de reações positivas no grupo de 20 |— 30 e 30 |— 40 anos. No confronto com São Paulo a população do Alto Xingu mostrou proporção significativamente menor no grupo de 20 |— 30 anos.

6. Os resultados do Alto Xingu, no seu conjunto, não diferem de forma acentuada, como se poderia supor pelas condições de vida do índio, daqueles observados em duas populações brasileiras (Amapá e São Paulo), com graus de civilização mais avançados. As diferenças observadas não são de magnitude suficiente para fazer admitir a existência de estrutura epidemiológica distinta para a toxoplasmose no Alto Xingu, em relação ao Amapá e São Paulo.

7. Nossos resultados permitem afirmar que os hábitos civilizados não exercem influência sobre a prevalência de anticorpos ao toxoplasma.

RESUMO

A pesquisa de anticorpos ao *Toxoplasma gondii* em 254 índios do Alto Xingu, Brasil Central, pela técnica da imunofluorescência indireta revelou 51,6% de reações positivas de título igual ou superior a 1/16. A população indígena do Alto Xingu é avaliada em 600 índios, distribuídos por nove tribos, que vivem em relativo estado de isolamento mantendo muito de seus hábitos e costumes primitivos. Os resultados foram comparados com os de outros dois inquéritos realizados em áreas geográficas diferentes do Brasil (no Território do Amapá e na cidade de São Paulo), nos quais os autores utilizaram técnica sorológica superponível àquela empregada por nós. Os resultados do Alto Xingu, no seu conjunto, não diferem de forma acen-

tuada, como se poderia supor pelas condições de vida do índio, daqueles observados no Amapá e São Paulo, e em populações com graus de civilização mais avançados.

* * *

AGRADECIMENTOS — A todos que, participando das atividades que a Escola Paulista de Medicina desenvolve no Parque Nacional do Xingu, contribuíram para a realização do presente trabalho.

Aos Professores Drs. Jairo Ramos e Walter Leser, a quem dedicamos este trabalho.

Ao Prof. Dr. Magid Iunes, pelo estímulo e apoio que nos proporcionou, no Departamento de Medicina Preventiva da Escola Paulista de Medicina.

Ao Prof. Dr. Oswaldo Luiz Ramos pela orientação na elaboração e redação do presente trabalho.

Aos irmãos Orlando e Claudio Villas Boas, a cujo discernimento deve-se o intercâmbio científico estabelecido entre o Parque Nacional do Xingu e a Escola Paulista de Medicina, e que nos deram constante apoio na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos da Silva Lacaz, pelas condições de trabalho que nos proporcionou no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, e ao Dr. Mario E. Camargo, pela orientação prestada na execução das reações sorológicas.

Ao Prof. Dr. R. Vanbreuseghen, do Instituto de Medicina Tropical de Antuérpia e da Universidade Livre de Bruxelas, pelas sugestões apresentadas na fase inicial deste trabalho. Ao Dr. De Meuter, Chefe do Laboratório de Toxoplasmose, do Instituto Pasteur de Bruxelas, pela atenção que nos dispensou durante nosso estágio em seu serviço.

Ao Prof. Dr. Carlos d'Andretta Jr. pela inestimável cooperação e pelas informações parasitológicas fornecidas, sobre o Alto Xingu.

Ao Dr. Luiz Candido de Souza Dias, cuja colaboração se fez presente nas diferentes etapas deste trabalho.

Aos Drs. José Marlet, Neil Ferreira Novo e Elias Rodrigues de Paiva, pela análise estatística. Ao acadêmico Aparecido Bernardo Pereira pela confecção dos gráficos.

Ao Prof. Dino Preti, pela revisão ortográfica.

Ao Dr. Olmar Salles de Lima pelas sugestões apresentadas na revisão do texto.

À Srta. Maria Berta Fischer pela dedicação na parte datilográfica, e ao técnico Guilherme Fuentes pelo cuidadoso trabalho de impressão.

Nossos agradecimentos à Força Aérea Brasileira, em especial à 4.^a Zona Aérea, que possibilitou o transporte das equipes médicas de São Paulo ao Xingu.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BARUZZI, R. G. & AMATO Neto, V. — Inquérito sorológico sumário, para toxoplasmose, entre índios do Parque Nacional do Xingu. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 8:277-280, 1966.
2. BEVERLEY, J. K. A. & MACKAY, R. R. — Ovine abortion and toxoplasmosis in the East Midlands. Vet. Rec. 74:499-501, 1962.
3. BEVERLEY, J. K. A.; SKIPPER, E. & MARS-HALL, S. C. — Acquired toxoplasmosis with a report of a case of laboratory infection. Brit. Med. J. 913:577-578, 1955.
4. CAMARGO, M. E. — Improved technique of indirect immunofluorescent or serological diagnosis of toxoplasmosis. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 6:117-118, 1964.
5. CAMARGO, M. E. — Estudo comparativo das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta, para a toxoplasmose, em 1.000 soros humanos. Comportamento anômalo de alguns soros. Rev. Inst. Adolfo Lutz 24:1-26, 1964. Tese. F.M.U.S.P.
6. CASTELLANI, A. — Note on certain protozoal-like bodies in a case of protracted fever with Splenomegaly. J. Trop. Med. Hyg. 17:113-114, 1914.
7. CATHIE, I. A. B. — Toxoplasma adenopathy in a child with isolation of the parasite. Lancet 2:115-116, 1954.
8. CHALMES, A. J. & KAMAR, A. — *Toxoplasma pyrogenes* Castellani 1913. J. Trop. Med. Hyg. 23:45, 1920.
9. CHRISTIANSEN, M. & SIIM, J. Chr. — Toxoplasmosis in hares in Denmark, Serological identity of human and hare strains of toxoplasma. Lancet 1:1201-1203, 1951.
10. COCHRAN, W. G. — Some methods for strengthening the common X² test. Biometrics 10:417-451, 1954.
11. COLE, C.; PRIOR, J. A.; DOCTON, F. L.; CHAMBERLAIN, D. M. & SASLAW, S. — Toxoplasmosis. III Study of families exposed to their toxoplasma infected pets dogs. Arch. Intern. Med. 92:308-313, 1953.
12. COUTINHO, J. O. & D'ANDRETTA Jr., C. — Considerações sobre *Pedicularis* dos indígenas do Alto Xingu. [Em elaboração].
13. d'ANDRETTA Jr., C. — Inquérito de entero-parasitoses dos indígenas do Parque Nacional do Xingu. [No prelo].
14. d'ANDRETTA Jr., C.; BARUZZI, R. G.; SOUZA DIAS, L. C.; PENTEADO Jr., H.; KAMEYAMA, I. & SARMENTO, M. F. — Inquérito epidemiológico de malária do Parque Nacional do Xingu. [Em elaboração].
15. DEANE, L. M. *et alii* — Inquérito de toxoplasmose e tripanossomiase realizado no Território do Amapá pela III Bandeira Científica do Centro Acadêmico "Oswaldo Cruz" da F.M.U.S.P. Rev. Med. (S. Paulo) 47:1-12, 1963.
16. DEANE, M.P. — Estudos sobre a transmissão do *T. gondii*. II. Nota sobre a transmissão experimental pelo carrapato *Amblyoma cajennense*. Rev. Bras. Malariol. 10:551-555, 1958.
17. DELASCIO, D. — Toxoplasmose congênita (Aspectos clínicos obstétricos e experimentais). Mat. e Inf. 15:179-532, 1956. Tese: São Paulo, F.M.U.S.P., 1956.
18. DEMONTS, G.; COUREUR, J.; ALISON, F.; BAUDELLOT, J.; GERBEAUX, J. & LELONG, M. — Étude épidémiologique sur la toxoplasmose: de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. Rev. Franç. Etud. Clin. Biol. 10:952-958, 1965.
19. ELTON, Ch.; DAVIS, D. H. S. & FINDLAY, G. M. — An epidemic among voles (*Microtus agrestis*) on the Scottish border in the Spring of 1934. J. Anim. Ecol. 4:277-288, 1935.
20. ERICHSEN, S. and HARBOE, A. — Toxoplasmosis in chickens. I. An epidemic outbreak of toxoplasmosis in a chicken flock in southeastern Norway. Acta Path. Microbiol. Scand. 33:56-71, 1953.
21. FEDOROVITCH, A. I. — Hémoparasites trouvés dans un cas de fièvre chronique. Ann. Inst. Pasteur 30:249-250, 1916.
22. FELDMAN, H. A. & MILLER, L. T. — Serological study of toxoplasmosis prevalence. Amer. J. Hyg. 64:320-335, 1956.
23. FLETCHER, S. — Indirect fluorescent antibody technique in the serology of *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Path. 18:193-199, 1965.

24. FRENKEL, J. K. — Dermal hypersensitivity to toxoplasma antigens (Toxoplasmins). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 68:634-639, 1948.
25. FULTON, J. D. — Micro-agglutination test for toxoplasma antibodies. Immunology 9:491-495, 1965.
26. FULTON, J. D. & TURK, J. L. — Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. Lancet 2:1068-1069, 1959.
27. FULTON, J. D. & A. VOLLER — Evaluation of immunofluorescent and direct agglutination methods for detection of specific toxoplasma antibodies. Brit. Med. J. 2:1173-1175, 1964.
28. GARIN, J. P. & AMBROISE-THOMAS, P. — Le diagnostic sérologique de la toxoplasmose par la méthode des anticorps fluorescents (Technique indirecte). Presse méd. 71:2485-2488, 1963.
29. GIBSON, C. L.; EYLES, D. E.; COLEMAN, N. & SMITH, C. S. — Serological response of a rural negro population to the Sabin-Feldman Cytoplasm-modifying test for toxoplasmosis. Amer. J. Trop. Med. 5:722-783, 1956.
30. GIBSON, C. L. & COLEMAN, N. — The prevalence of *Toxoplasma* antibodies in Guatemala and Costa Rica. J. Trop. Med. 7:334-338, 1958.
31. GIROUD, P.; LE GAC, P. & GAILLARD, J. — Mise en évidence de toxoplasmes de souris inoculées avec les broyats de *Thrombocula legaoi* (Marc André, 1950), recueillis sur *Lemniscomys barbarus striatus* et sur *Myiomys cunninghamii alberti*, capturés en Oubanghi — Chari. Bull. Soc. Path. Exot. 45:449-451, 1952.
32. GOLDMAN, M. — Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein-labelled antibody. I. The reaction in smears of peritoneal exudate. J. Exp. Med. 105:549-556, 1957.
33. GOLDMAN, M. — Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein-labelled antibody. II. A new serologic test for antibodies to toxoplasma based upon inhibition of specific staining. J. Exp. Med. 105:557-573, 1957.
34. HUTCHISON, W. M. — Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. Nature (London) 206:961-962, 1965.
35. JACOBS, L. & LUNDE, M. N. — A hemagglutination test for toxoplasmosis. J. Parasit. 43:308-314, 1957.
36. JACOBS, L.; REMINGTON, J. S. & MELTON, M. L. — The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. J. Parasit. 46:11-21, 1960.
37. JACOBS, L.; REMINGTON, J. S. & MELTON, M. L. — A survey of meat samples from swine, cattle and sheep for the presence of encysted toxoplasma. J. Parasit. 46:23-28, 1960.
38. JAMRA, L. M. F. — Contribuição para a epidemiologia da toxoplasmose. Inquirido em 100 famílias de uma área da cidade de S. Paulo. Tese. F.M.U.S.P., 1964.
39. KELEN, A. E.; AYLON-LEINDL, L. & LAB-GOFFSKY, N. A. — Indirect fluorescent antibody method in serodiagnosis of toxoplasmosis. Canad. J. Microbiol. 8:545-554, 1962.
40. LEVI, G. C.; HYAKUTAKE, S.; AMATO Neto, V. & CORRÊA, M. O. A. — Presença do *Toxoplasma gondii* na saliva de pacientes com toxoplasmose. Eventual importância dessa verificação quanto à transmissão da doença. (Nota prévia). Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 10:54-58, 1968.
41. LUNDE, M. N. & JACOBS, L. — A comparison of results of hemagglutination and dye tests for toxoplasmosis in a survey of Trinidad Natives. Amer. J. Trop. Med. 7:523-525, 1958.
42. MAGALDI, C.; ELKIS, H.; PATTOLI, D.; QUEIROZ, J. C.; COSCINA, A. L. & FERREIRA, J. M. — Surto de toxoplasmose em um seminário de Bragança Paulista (Estado de São Paulo). Aspectos clínicos, sorológicos e epidemiológicos. Rev. Saúde Publ. S. Paulo 1:141-171, 1967.
43. MAGALDI, C.; ELKIS, H.; PATTOLI, D.; QUEIROZ, J. C. & COSCINA, A. L. — Epidemia de toxoplasmose no Centro Técnico da Aeronáutica (São José dos Campos). Observações clínicas, sorológicas e epidemiológicas preliminares. Nota prévia. Rev. Paul. Med. 70:256-257, 1967.
44. MÖLLER, F. — Three casuiste reports of toxoplasmosis in Zoo-Animals (*Macropus bennetti*, *Marmota marmota*, *Lepus timidus*) Nord. Vet. Med. 14:233-243, 1962.
45. MORALES, A.; MOSCA, A.; SILVA, S.; SIMS, A.; THIERMANN, E.; KNIERIM, F. & ATIAS, A. — Estudio sorológico sobre toxoplasmosis y otras parasitosis in Isla de Pascua. Bol. Chil. Parasit. 41:82-87, 1961.
46. NICOLAU, S. & RAVELO, A. — La réaction de fixation du complément dans de sérum et dans des extraits d'organes d'animaux atteints de toxoplasmose expérimentale. Bull. Soc. Path. Exot. 30:855-859, 1937.
47. NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. — Sur un protozoire nouveau du gondi: toxoplasma. Arch. Inst. Pasteur Tunis, 2:43-50, 1909.
48. NOBREGA, P.; TRAPP, E. & GIOVANNONI, M. — Toxoplasmose espontânea da galinha, Arch. Inst. Biol. 22:43-50, 1955.
49. NUNEN, M. C. J. van & VEEN, J. van der — Examination for toxoplasmosis by the fluorescent antibody technique. Trop. Geogr. Med. 17:246-253, 1956.

50. NUSSENZWEIG, R. S. — Toxoplasmose. Inquérito sorológico feito pela prova do corante em doadores de sangue. Hospital 51:723-728, 1957.
51. NUSSENZWEIG, R. S. & DEANE, M. F. — Estudos sobre a transmissão do *Toxoplasma gondii*. I. Experiências com triatomíneos. Rev. Bras. Malar. 10:543-550, 1958.
52. PANDE, P. G.; SHUKLA, R. R. & SEKARIAH, P. C. — Toxoplasma from the eggs of the domestic fowl (*Gallus gallus*). Science 133:648, 1961.
53. RATCLIFFE, H. L. & WORTH, C. B. — Toxoplasmosis of captive wild birds and mammals. Amer. J. Path. 37:655-667, 1951.
54. RAWAL, B. D. — Toxoplasmosis. A dye test survey on sera from vegetarians and meat eaters in Bombay. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 53:61-63, 1959.
55. SABIN, A. B. & OLITSKY, P. K. — Toxoplasma un obligate intracellular parasitism. Science 85:336-338, 1937.
56. SABIN, A. B. & FELDMAN, H. A. — Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). Science 108:660-663, 1948.
57. SIIM, J. Chr. & LIND, K. — A toxoplasma flocculation test. Acta Path. Microbiol. Scand. 50:445-446, 1960.
58. SILVA, M. PIO da — Contribuição para o estudo do sangue periférico e da medula óssea em índios do Alto Xingu. São Paulo, E.P.M., 1966. Tese.
59. SPLENDORE, A. — Un nuovo protozoa parassita de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Rev. Soc. Sci. 3:109-112, 1908.
60. STEINEN, K. von den — Entre os aborígenes do Brasil Central, 1887. Texto alemão em 1894. Traduzido pelo Depart. Cultura São Paulo, 1940.
61. TORRES, C. M. — Sur une nouvelle maladie de l'Homme, caractérisée par la présence d'un parasite intracellulaire, très proche du toxoplasma et de l'encephalitozoon, dans le tissu musculaire cardiaque, les muscles du squelette, le tissu cellulaire souscutané et le tissu nerveux. C. R. Soc. Biol. 97:1778-1781, 1927.
62. TUMANG, A. J. & PIEDADE, E. T. — Carie dental. Doenças periodontais e Higiene oral em indígenas brasileiros. Bol. Ofic. Sanit. Panamer. 64:103-109, 1968.
63. UMDENSTOCK, R.; MANDOU, R. & PESTRE-ALEXANDRE, M. — Accident de laboratoire suscité par une morsure de souris toxoplasmique. Auto observation. Bull. Soc. Path. Exot. 58:207-209, 1965.
64. VILLAS BOAS, O. & VILLAS BOAS, C. — Comunicação pessoal, Livro em elaboração, 1968.
65. WALTON, B. C.; BENCHOFF, B. M. & BROOKS, W. H. — Comparison of the indirect fluorescent antibody test and methylene blue dye test for detection antibodies to *Toxoplasma gondii*. Amer. J. Trop. Med. 15:149-152, 1966.
66. WARREN, J. & SABIN, A. B. — The complement fixation reaction in toxoplasmic infection, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 51:11-14, 1942.
67. WIKTOR, T. J. — Toxoplasmose animale. Sur une épidémie des lapins et des pigeons à Stanleyville (Congo Belge). Ann. Soc. belge. Méd. Trop. 30:97-107, 1950.
68. WOLF, A. & COWEN, D. — Granulomatus encephalomyelitis due to an encephalitozoon (*Encephalitozoic encephalomyelitis*). A new protozoan discase of man. Bull. Neurol. Inst., N. Y. 6:306-371, 1937.
69. WOLF, A.; COWEN, D. & PAIGE, B. H. — Toxoplasmic encephalomyelitis. III. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoan. Amer. J. Path. 15:657-604, 1939.

Recebido para publicação em 8 de setembro de 1969.

COMPOSIÇÃO E IMPRESSÃO
TIPOGRAFIA FONSECA LTDA.
RUA CORIOLANO, 962
FONE: 62-5205
SÃO PAULO
CGC 61.276.648