

VOLUME 32

NÚMERO ÚNICO

1972

REVISTA
do
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE
COORDENADORIA DOS SERVICOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
S. PAULO - BRASIL

REVISTA
DO
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

REDATOR RESPONSÁVEL

AUGUSTO DE ESCRAGNOLLE TAUNAY

Diretor do Instituto Adolfo Lutz

COMISSÃO DE REDAÇÃO

JOSE PAULO GONZAGA DE LACERDA

JOSE LOPES NETO

LUIS FLORENCIO DE SALLES-GOMES

MÁRIO SCARPELLI

WALDOMIRO PREGNOLATTO

SECRETÁRIA-REDATORA

DEBORA DOMINGUES ESTRELLA REBOCHO

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
S. PAULO - BRASIL

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

REDAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO
BIBLIOTECA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

CAIXA POSTAL, 7027

SÃO PAULO, S.P. — BRASIL

ENDEREÇO TELEGRÁFICO: IALUTZ

R E V I S T A A N U A L

TIRAGEM: 1.000 EXEMPLARES

REV. INST. ADOLFO LUTZ

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Rev. Inst. Adolfo Lutz	São Paulo	Volume 32	1972
------------------------	-----------	-----------	------

CONTEUDO

Necrológio

Bruno Rangel Pestana — "Servidor Emérito"	1
---	---

Artigos originais

Lisotipos e tipos fermentativos de <i>Salmonella typhi</i> isoladas no estado de São Paulo	
<i>Vi phage typing and fermentative types of Salmonella typhi isolated in state of São Paulo, Brazil</i>	
ERNESTO HOFER; JOSÉ ROBERTO CARNEIRO NOVAES & GIL VITAL ALVARES PESSÓA	7
Reação de fixação em superfície como método diagnóstico laboratorial da febre tifóide	
<i>Use of surface fixation in the laboratorial diagnosis of typhoid fever</i>	
CELSO SOARES HABERBECK BRANDÃO	17
Emprego do ácido rosólico na identificação de espécies do gênero <i>Brucella</i>	
<i>Use of rosolic acid in the identification of species of the genus Brucella</i>	
SEBASTIÃO DE CAMARGO CALAZANS & CELSO SOARES HABERBECK BRANDÃO	37
Incidência de reagentes à prova da imunofluorescência indireta para o diagnóstico da toxoplasmose entre escolares do município de Presidente Prudente	
<i>The incidence of reagents to indirect immunofluorescence test for diagnosis of toxoplasmosis among students in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil</i>	
MARCELO OSWALDO ÁLVARES CORRÊA; SABURO HYAKUTAKE & JOSÉ FERREIRA TOGNOLI	41

Resistência infecciosa a drogas em amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de animais	
<i>Infectious drug resistance in Escherichia coli strains isolated from animals</i>	
GILBERTI MORENO	47
Resistência a drogas em enterobactérias isoladas de animais silvestres	
<i>Drug resistance among enteric bacteria strains isolated from mammals encountered in wooded regions of Botucatu, Brazil</i>	
GILBERTI MORENO; DARCI S. AOKI WATANABE; NORMA GERUSA S.SILVA; CARLOS ALBERTO DE MAGALHÃES LOPES; EUNICE SEABRA & CLAUDINE GRANADO	57
Resistência a drogas em amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de animais	
<i>Drug resistance in Escherichia coli strains isolated from animals</i>	
GILBERTI MORENO	63
Resíduos de pesticidas clorados em águas	
<i>Chlorinated pesticide residues in water</i>	
WALKYRIA H. LARA & HELOISA H.C. BARRETO	69
Sobre a freqüência de isolamento de enterobactérias patogênicas nas fezes de crianças de Ribeirão Preto, São Paulo	
<i>Study of frequency of pathogenic enterobacteria in children under five years old in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil</i>	
IVAN PRADO DA CUNHA; MITUCA KAKU; IZABEL YOKO ITO & OCTÁVIO BARACCHINI	75
Método de dosagem turbidimétrica de pequenas quantidades de DDT e de BHC, após sua separação e identificação por cromatografia em camada delgada	
<i>Turbidimetric method for the dosage of small quantities of DDT and BHC after their separation and identification through the thin-layer chromatography process</i>	
PAULO DE ALMEIDA VIDAL; & ALMIR JOSÉ RICCIARDI	79
Considerações sobre novo surto epidêmico de leptospiroses na cidade do Recife em 1970	
<i>Considerations on a new outbreak of leptospirosis in the city of Recife, Pernambuco, Brazil, in 1970</i>	
MARCELO OSWALDO ÁLVARES CORRÊA; SABURO HYAKUTAKE & RINALDO DE AZEVEDO	83

Resíduos de pesticidas clorados em alimentos <i>Chlorinated pesticide residues in foods</i>	
WALKYRIA H. LARA & HELOISA H.C. BARRETO	89
Meios de Rugai e lisina - motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias <i>Medium of Rugai and lysine-motility combined in one single tube for the presumptive identification of enterobacteriaceae</i>	
GIL VITAL ALVARES PESSÔA & ENY APARECIDA MATHEUS DA SILVA	97
Estudo polarográfico de alguns corantes usados em alimentos <i>Polarographic study of some permitted dyes in food</i>	
GERMÍNIO NAZÁRIO & ODAIR ZENEON	101
Aminoácidos de hidrolisados de proteína de soja. Dosagem de ácido glutâmico <i>Detection of aminoacids in protein hydrolysates of soybean. Determination of glutamic acid</i>	
MARIA ELISA WOHLERS DE ALMEIDA & ANTONIA MATTOS SIMÃO	105
Teor de cálcio, ferro e fósforo em alguns peixes brasileiros de água doce <i>Contents of calcium, iron and phosphorus in some brazilian freshwater fishes</i>	
LUÍS A. ARRUDA CAMARGO; WILSON J. YASAKA; SEIZI OGA & KAZUE WAKI	113
Nota técnica	
Meio para diferenciação da tribo Proteeeae de outras enterobactérias <i>A simplified medium for differentiation of members of the tribe Proteeeae from other enterobacteria</i>	
GIL VITAL ALVARES PESSÔA & DILMA SCALA GELLI	95

AOS COLABORADORES

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

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

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Os originais deverão ser redigidos na ortografia oficial (1943, com alt. Lei n.º 5.765 de 18.12.1971), 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. As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos, fórmulas, equações, mapas, diagramas), legendas e rodapés deverão ser apresentados à parte, devidamente identificados, assinalando-se, no texto, onde serão inseridos.

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

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

TÍTULO – Deverá ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho. Não deverão ser empregadas abreviaturas.

RESUMOS – Não deverão exceder 200 palavras. Serão concisos e claros, pondo em relevo de forma precisa os fatos essenciais necessários à conclusão.

ABREVIATURAS – No texto, deverão ser 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 do(s) prenome(s) (ou das iniciais dos prenomes): 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, ligados por “&”: GOMES, J. A. & TOURAINE, 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 primeiro autor, seguido da expressão et alii: RACHOU, R. G. et alii.

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

Na lista de referências – Serão ordenados numericamente, em ordem alfabética, como segue:

Para artigos

Sobrenome do autor(es) seguido(s) das iniciais do(s) prenome(s), 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, na falta destes, do editor, seguido dos prenomes, título, edição (se não primeira), tradução (se for o caso), local de publicação, editor, ano de publicação, número de volume, página(s) citada(s). Ex.:

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

ILUSTRAÇÕES — Serão citadas no texto como "Fig.", numeradas e virão acompanhadas de legendas explicativas. Os desenhos, gráficos, fórmulas, equações, mapas, 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 à 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 OU TABELAS — Não deverão exceder as dimensões do texto da Revista. Os respectivos títulos deverão indicar claramente o conteúdo; se possível, seguir as "Normas de apresentação tabular" estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística (publicadas na Rev. Bras. Est., 24: 42-60, 1963).

No corpo da tabela ou quadro, nenhuma casa ficará vazia; segundo convenção internacional, a ausência de dados numéricos será representada por:

- (traço horizontal) quando o fenômeno não existe;
- ... (três pontos) quando o dado é desconhecido, não implicando, porém, afirmativa de que o fenômeno exista ou não;
- 0; 0,0; 0,00 (zero) quando o fenômeno existe, sendo sua expressão, porém, tão pequena que não atinja a unidade adotada no quadro. Exemplos: se todas as medidas figurarem em décimos de milígrama e houver uma menor que 0,05 mg, inscrever-se-á 0,0; se todas figurarem em centésimos de milímetro e houver menores que 0,005 mm, essas serão representadas por 0,00.

DA PUBLICAÇÃO

1. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação, que poderá sugerir ao autor, alterações do original.

2. *Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.*
3. *Na publicação do artigo, constará obrigatoriamente, em rodapé, a data de recebimento.*
4. *A primeira prova tipográfica será revisada pela secretária da redação e conferida pelo autor, que a rubricará.*
5. *Os originais de trabalhos aceites para publicação não serão devolvidos aos autores.*
6. *Os autores terão direito a 70 separatas; quando desejarem maior número, deverão entender-se previamente com a secretária da Revista.*
7. *É proibida a reprodução no todo ou em parte de trabalhos publicados na Revista, sem prévia autorização do autor e do Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz. É permitida, entretanto, a reprodução de resumos, com a devida citação da fonte.*

Necrológio



BRUNO RANGEL PESTANA

“Servidor Emérito”

É com profundo pesar que esta Revista abre as páginas deste número para prestar homenagem póstuma a Bruno Rangel Pestana, antigo colaborador desta Revista e ex-Diretor da Divisão de Bromatologia e Química deste Instituto, recentemente falecido nesta Capital.

Servidor exemplar e dedicado, possuidor de elevado valor moral e científico, serviu durante quase meio século, procurando, no decorrer de toda a sua vida funcional, executar bem as tarefas que lhe foram confiadas, preocupando-se acima de tudo com a defesa do bem e da saúde de seus semelhantes.

Bruno Rangel Pestana nasceu no dia 15 de setembro de 1881, na capital do estado de São Paulo. Descendente de tradicional estirpe paulista, foram seus dignos genitores Francisco Rangel Pestana e Damiana Quirino Rangel Pestana.

Diplomado em Farmácia no ano de 1902 pela Faculdade de Farmácia anexa à Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, foi convidado, em 1907, para integrar o quadro técnico do Instituto Seruniterápico, instalado em São Paulo por sugestão e influência do cientista Adolfo Lutz.

Em 1911, representou o estado de São Paulo na Exposição Internacional de Dresden, na Alemanha, onde permaneceu durante um ano aperfeiçoando seus conhecimentos técnicos que redundaram na publicação de um trabalho sobre a “Reação de Abderhalden”.

Em 1914, como assistente de Theodoro Bayma e em companhia de Sebastião de Camargo Calazans, combateu e dizimou uma epidemia de febre tifóide que grassava em São Paulo e em Curitiba.

Em 1915, ao lado de Vital Brasil, realizou estudos sobre o ofidismo e sobre soros peçonhentos, dedicando-se também a pesquisas sobre a moléstia de cães denominada Nambyuvú. Nesse mesmo ano dedicou-se a estudos de lepra e difteria. Ainda, em 1915, trabalhou ao lado de Theodoro Bayma e Adolfo Lindenberg; com o primeiro, estudou o parasitismo intestinal dos imigrantes do Império Japonês e, com o segundo estudou a quimioterapia das bactérias ácido resistentes.

Em 1917, Artur Neiva, então diretor do Serviço Sanitário do Estado de São Paulo, enviou ao diretor do Instituto Bacteriológico, na ocasião Theodoro Bayma, o ofício nº 2335, transmitindo os elogios do Presidente do Estado, feitos a Bruno Rangel Pestana pelo "brilhante desempenho" em sua missão em Curitiba, como integrante da "Comissão da Febre Tifóide" de outubro de 1917.

Durante o surto de gripe epidêmica de 1918, que grassou em São Paulo, prestou colaboração eficiente na debelação do mal.

Em 1920, dentro das atribuições internas de atividades do Instituto Bacteriológico, foi encarregado dos Serviços da Tuberculose, Lepra, Lues, Difteria e Parasitos intestinais.

Em 1925, por Decreto de 23 de julho do mesmo ano, voltou a trabalhar no Instituto Butantan, visto terem sido os Institutos Bacteriológico, Serunterápico e Vacinogênico integrados ao primeiro, onde permaneceu até 1931. Com Jaime Pereira estudou as propriedades da adrenalina oxidada e, com Sebastião Camargo Calazans, constatou o valor do ácido rosólico no isolamento dos germes colitíficos desintéricos.

Em 1932, tomou parte ativa na Revolução Constitucionalista de 9 de julho, quando prestou eficaz colaboração.

Em 1936, fez jus ao Ofício P/1051 do Diretor Geral do Serviço Sanitário, de 28 de agosto daquele ano, pelo seu esforço, coadjuvado por outros servidores.

Em 1938, integrou a "Comissão de Estudos da Leishmaniose", com a colaboração de Humberto Pascale e Samuel Pessoa; terminados esses estudos, publicou, com o último, importante monografia de grande significado para a bibliografia médica, referente a Leishmaniose.

Em outubro de 1940, com a criação do Instituto Adolfo Lutz pela fusão do Instituto Bacteriológico e do Laboratório de Análises Químicas e Bromatológicas, foi nomeado chefe da Sub-Divisão de Bromatologia e Química.

Em 20 de novembro de 1941 foi designado para fazer parte da Comissão que tinha por finalidade a revisão e atualização do Regulamento do Policiamento Sanitário de Alimentação Pública, aprovado pelo Decreto nº 10.657 de 31 de outubro de 1939.

Em julho de 1943, foi enviado ao Rio de Janeiro pelo então Interventor Federal em São Paulo, a fim de ultimar entendimentos sobre a padronização de paradigmas e métodos analíticos referentes às atividades bromatológicas. Representando o estado de São Paulo, assinou o Convênio dos Gêneros Alimentícios com a Prefeitura do Distrito Federal, no sentido de serem adotados os mesmos padrões, tipos, características, definições e métodos analíticos pelas duas maiores cidades brasileiras – São Paulo e Rio de Janeiro.

Em fevereiro de 1944, representou o Instituto Adolfo Lutz junto ao Ministério da Agricultura, na Comissão de Fiscalização dos Produtos Alimentícios de Origem Animal e, em agosto do mesmo ano, participou das conversações que o referido Ministério realizou sobre a fiscalização das condições higiênicas e sanitárias das empresas que exploravam as águas engarrafadas, estabelecendo normas para a referida fiscalização.

Em abril de 1946, representou oficialmente o Instituto Adolfo Lutz na Primeira Jornada Brasileira de Bromatologia realizada na Capital de São Paulo. Exerceu nessa jornada o cargo de Presidente da Comissão Científica, merecendo significativo e honroso voto de louvor.

Em janeiro de 1947, através de decreto governamental, foi designado para assinar em nome do Governo de São Paulo o convênio entre este Estado e o Distrito Federal para adoção do Regula-

mento do Policiamento da Alimentação Pública. Nesse mesmo mês, na cidade de Porto Alegre, participou do 5º Congresso Brasileiro de Química, patrocinado pela Associação Química do Brasil.

Em janeiro de 1948, integrou a comissão encarregada de estudar a Regulamentação do emprego do guaraná nas bebidas refrigerantes.

Em setembro de 1951, foi nomeado Diretor da Diretoria de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, cargo criado pela lei nº 990/51, que deu nova estrutura legal ao Laboratório de Saúde do Estado de São Paulo.

Em 20 do mesmo mês, foi designado pelo Governo do Estado para acompanhar os trabalhos da Comissão Executiva de Revisão da Farmacopéia, que redundaram na aprovação e edição de uma nova Farmacopéia Brasileira.

Em 6 de fevereiro de 1952, como justo prêmio às suas múltiplas atividades, o Sr. Governador do Estado de São Paulo, pelo Decreto nº 21.188, conferiu-lhe o honroso título de "Servidor Emérito". A sala onde trabalhou no Instituto Adolfo Lutz foi denominada "Sala Bruno Rangel Pestana".

Após a decorrência de quase cinquenta anos de contínuas e inestimáveis atividades funcionais, foi colhido pela compulsória e, no dia de seu setuagésimo aniversário natalício foi aposentado mas, mesmo nessa situação de jubulado, nunca deixou de se interessar pela vida do Instituto Adolfo Lutz que fazia parte integrante de sua vida.

Deixou Bruno Rangel Pestana vasta bagagem científica, grande parte publicada nesta Revista, destacando-se dentre seus trabalhos os constantes da bibliografia seguinte:

BIBLIOGRAFIA

- PESTANA, B.R. — Algumas notas sobre a farmacopéia paulista. *Un. Pharm.* São Paulo, 4:119-129, 1919.
- PESTANA, B.R. — Considerações acerca de alguns protozoários e outros parasitas encontrados em fezes humanas. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 8(5): 101-113, 1917.
- PESTANA, B.R. — Considerações epidemiológicas a respeito da febre amarela e da febre amarela sylvestre. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 34(5): 441-485, 1937.
- PESTANA, B.R. — Considerações epidemiológicas a respeito do tifo exantemático em São Paulo. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 48(4): 287-347, 1944.
- PESTANA, B.R. — Da meningite tuberculosa. Diagnóstico bacteriológico, frequência da meningite tuberculosa, o tipo de bacilo bovino em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 1(1): 40-54, 1941.
- PESTANA, B.R. — A febre typhoide em S. Paulo. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 9(5): 101-115; 9(6): 123-136; 9(7): 149-164, 1918.
- PESTANA, B.R. — A luta contra a difteria. O soro anti-difterico do Instituto Sôrotherapico do Butantan. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 4(3): 58-61, 1915.
- PESTANA, B.R. — O Nambyuvú. *Rev. Med.* (São Paulo), 13: 423-426, 1910.
- PESTANA, B.R. — Notas sobre o tratamento da lepra. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 3(1): 10-13, 1914.
- PESTANA, B.R. — Notas sobre o veneno de cobras de especies brasileiras. A substância hemolytica. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 6(5): 108-112, 1916.
- PESTANA, B.R. — Notas sobre o veneno das cobras brasileiras. Imunidade Natural. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 5(2/4): 120-130, 1915.
- PESTANA, B.R. — Profilaxia da leishmaniose. In: *Anais da Jornada de Economia Rural.* São Paulo, Secretaria da Agricultura, 1947. p. 116.
- PESTANA, B.R. — Reação de Abderhalden para diagnóstico da gravidez. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 1(2): 82-83, 1913.

- PESTANA, B.R. — Serotherapie anti-ophidica. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 3(2): 27-37, 1914.
- PESTANA, B.R. — Sobre o poder hemolytico das peçonhas de algumas espécies brasileiras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA E CIRURGIA, 2.º, São Paulo, 1907. *Anais*.
- PESTANA, B.R. — Tipos de bacilos tíficos e seu valor epidemiológico. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 39(1): 19-25, 1940.
- PESTANA, B.R. — Vacina e o soro anti-pestosos do Instituto Seroterapico do Butantan. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 3(3): 58-60, 1914.
- PESTANA, B.R. & ANDRADE, M.C. — Contribuição ao estudo do grupo coliforme e sua significação nos exames de água. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 39(6): 435-466, 1940.
- PESTANA, B.R. & FARACO, M.J. — Do emprego do meio de agar-desoxycholato de sodium-citrato (Leifson) para isolar bacilos disentericos. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 40(10): 307-314, 1940.
- PESTANA, B.R. & FARACO, M.J. — Exame bacteriológico de fezes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, 2(2): 269-287, 1942.
- PESTANA, B.R. & FERREIRA, M.F.Q. — Considerações sobre algumas propriedades bioquímicas do bacilo da difteria. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, 3(1): 32-43, 1943.
- PESTANA, B.R. & FERREIRA M.F.Q. — Diagnóstico bacteriológico da difteria por métodos rápidos. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 38(5): 393-399, 1939.
- PESTANA, B.R. & LIMA, E. — Estudo comparativo da contagem de germes do leite em placas de ágar standard e ágar-leite-triptona-glicosado e incubado ás temperaturas de 32 e 37°C. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, 2(1): 18-33, 1942.
- PESTANA, B.R. & PESSOA, S.B. — Leishmaniose tegumentar autoctone no município de São Paulo. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 38(6): 435-442, 1939.
- PESTANA, B.R. & RUGAI, E. — Contribuição ao estudo das pasteurelas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, 3(1): 59-74, 1943.
- PESTANA, B.R. & RUGAI, E. — Da presença de salmonelas nas carnes preparadas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, 7:5-7, 1947.
- PESTANA, B.R. & RUGAI, E. — O porco normal como portador de salmonelas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, 3(2): 232-235, 1943.
- PESTANA, B.R. & RUGAI, E. — Salmonelas isoladas de líquido céfaloraquidiano. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 39(5): 373-378, 1940.
- PESTANA, B.R. & TELLES, L.Q. — Membros manita-indol-negativos do gênero *Shigella*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, 7:8-40, 1947.
- PESTANA, B.R.; AMARAL, J.P. & BARRETO NETO, L.P. — Tipos de *C. diphtheriae* em São Paulo. Reações culturais, virulências, toxigenicidade e suas relações com os casos clínicos. *Mems Inst. Butantan*, 13: 407-430, 1939.
- PESTANA, B.R.; ARANTES, M. & RUGAI, E. — Pasteurelose humana. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 1(2): 357-360, 1941.
- PESTANA, B.R.; PESSOA, S.B. & CORREA, A. — Notas sobre a leishmaniose no município de Marília, São Paulo. *Folha Méd.*, 20: 97-98, 1939.
- PESTANA, B.R.; MELLO, M.S.; ALMEIDA, M.E.W. & TAVARES, J. — Contribuição para a padronização dos métodos físicos e químicos para análises de alimentos e bebidas. In: JORNADA BRASILEIRA DE BROMATOLOGIA, 1ª., São Paulo, 1946. *Anais*: São Paulo, Rev. Tribunais, 1950. v.2, p. 894.

Trabalhos de colaboração

- BAYMA, T. & PESTANA, B.R. — *Parasitismo intestinal nos imigrantes japonezes*. São Paulo, Instituto Bacteriológico, 1918. 5 p.
- BAYMA, T. & PESTANA, B.R. — Pseudo-areia intestinal. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 6(4): 82-83, 1916.
- BRAZIL, V. & PESTANA, B.R. — Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. *Rev. Med.*, (São Paulo), 12: 375-379, 415-425, 1909; 13: 61-64, 161-164, 1910.
- CALAZANS, C. & PESTANA, B.R. — Emprego do ácido rosolico no isolamento e identificação dos bacillos do grupo coli-typhico-dysenterico em meios solidos. *Mems Inst. Butantan*, 7: 285-302, 1932.

- LINDENBERG, A. & PESTANA, B.R. — Chemotherapeutische Versuche mit Fetten an Kulturen saurefester Bacillen. *Ztschr. Immunforsch. Exp. Ther.*, 32: 66-86, 1921.
- LINDENBERG, A. & PESTANA, B.R. — Ensaios de quimioterapia sobre os germes ácidos resistentes. *Bras. Méd.*, 34(37): 603-609, 1920.
- PEREIRA, J. & PESTANA, B.R. — A adrenalina oxidada perde suas propriedades farmacodinamicas? *Rev. Biol. Hyg.*, 1(2): 115, 1928. [Resumo de comunicação apresentada à sociedade de Biologia e Higiene, São Paulo, fev., 1927].
- PEREIRA, J. & PESTANA, B.R. — Sobre a actividade de pharmacodynamica dos produtos de oxydación da andrenalina. *Anais Paul. Med. Cirurg.*, 20(3/4): 33-34, 1929.
- PESSOA, S.B. & PESTANA, B.R. — Ensaio sôbre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana, com germens mortos. *Rev. Biol. Hig.*, 10(2): 112-118, 1940.
- PESSOA, S.B. & PESTANA, B.R. — Infecção natural do *Plebotomus migonei* por formas em leptomonas, provavelmente da *Leishmaniose brasiliensis*. *Acta Méd.* (Rio de Janeiro), 5(2): 106-111, 1940.
- PESSOA, S.B. & PESTANA, B.R. — A intradermo-reacção de Montenegro nas campanhas sanitárias contra a leishmaniose. *S. Paulo Méd.*, 2:133-151, 1940.
- PESSOA, S.B. & PESTANA, B.R. — Leishmaniose tegumentar urbana. *Arq. Hig. Saúde Publ.*, 8: 47-55, 1940.
- PESSOA, S.B. & PESTANA, B.R. — Lesões iniciais na leishmaniose tegumentar americana. *Acta Méd.* (Rio de Janeiro), 4(6): 267-271, 1939.
- PESSOA, S.B. & PESTANA, B.R. — Sobre a disseminação da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. *Folha Méd.*, 21: 20-23, 1940.
- VILLELA, F.; PESTANA, B.R. & PESSOA, S.B. — Presença da *Leishmania brasiliensis* na mucosa nasal sem lesão aparente, em casos recentes de leishmaniose cutânea. *Hospital* (Rio de Janeiro), 16(6): 953-960, 1939.

LISOTIPOS E TIPOS FERMENTATIVOS DE *SALMONELLA TYPHI* ISOLADAS NO
ESTADO DE SÃO PAULO (1)

VI PHAGE TYPING AND FERMENTATIVE TYPES OF *SALMONELLA TYPHI* ISOLATED
IN STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

ERNESTO HOFER (2)
JOSÉ ROBERTO CARNEIRO NOVAES (3)
GIL VITAL ÁLVARES PESSOA (3)

SUMMARY

HOFER, E.; NOVAES, J. R. C. & PESSOA, G. V. A. — Vi phage typing and fermentative types of *Salmonella typhi* isolated in the state of São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 7-15, 1972.

The distribution of lisotypes and fermentative types, according to Kristensen's scheme, in 201 samples of *Salmonella typhi* isolated in São Paulo, S.P. Brazil, from 1966 to 1971 was analysed.

Lisotypes A (37,81%), E 1 a (27,36%), F 1 (5,97%), negative vi-samples (5,97%) and L 1 (4,47%) were the most prevalent.

In respect to the biochemical classification, 50,74% of the samples were classified as of type I, 48,25% as of type II and 0,99% as of type III respectively.

INTRODUÇÃO

Destaca-se ainda a febre tifóide como uma das doenças de maior importância em nosso meio principalmente em decorrência das condições insatisfatórias de saneamento básico ofertadas às populações de grande parte de nossas cidades. Estas condições, associadas a alguns outros fatores, podem ser responsabilizadas pelo caráter endêmico desta enfermidade, subsistindo mesmo em regiões consideradas mais desenvolvidas do ponto de vista sócio-econômico, como no caso do Estado de São Paulo.

Fundamenta-se a análise epidemiológica da febre tifóide nos dados adquiridos das investigações laboratoriais, que proporcionam os elementos necessários para o esclarecimento

do curso e propagação desta entidade nosológica em uma população.

Uma das primeiras tentativas para filiação dos casos de febre tifóide está representada pelo comportamento heterogêneo das amostras de *Salmonella typhi*, diante da arabinose e xilose, preconizada por KRISTENSEN & HENRIKSEN^{13,14} em 1926 e 1938. Por esta técnica é possível classificar os bacilos típicos em quatro tipos, de acordo com as reações observadas. Todavia, com o advento da fagotipagem ou lisotipia, que veio a se constituir no procedimento mais apurado para a diferenciação de tipos de *Salmonella typhi*, proporcionando condições mais amplas e seguras para as interpretações das análises epidemiológicas, relegou-se a um segundo plano a classificação bioquímica de Kristensen.

(1) Realizado no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz, Guanabara, e na seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

(2) Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz.

(3) Do Instituto Adolfo Lutz.

Em 1936, pouco tempo após a descoberta da fração antigênica denominada Vi, em culturas de bacilos típicos por FELIX & PITT⁹ quase que de modo simultâneo e independentemente, CRAIGIE & BRANDON^{4,5}, SCHOLTENS²² & SERTIC & BOULGAKOW²³ descrevem o isolamento de bacteriófagos com ação específica para as amostras possuidoras, com total integridade, do antígeno Vi.

Posteriormente, CRAIGIE & YEN^{7,8}, constataram que um dos fagos, ao que denominaram Vi II, apresentava um extraordinário poder de adaptação desenvolvendo uma atividade lítica e seletiva para as amostras de bacilos típicos, sobre os quais eram propagados. Utilizando-o, em diluições ditas críticas, isto é — a maior diluição do fago que evidencia lise total ou confluyente nos crescimentos de *S.typhi* — tiveram estes autores, possibilidade de caracterizar pouco menos de duas dezenas de lisotipos deste microrganismo. Paulatinamente, foram acrescentados ao esquema incipiente de Craigie e Yen novas preparações adaptadas ao fago Vi II, que atualmente capacitam individualizar 87 tipos fágicos.

Considerando ser de excepcional interesse epidemiológico a avaliação dos lisotipos incidentes nas diferentes regiões do Brasil e admitindo-se as escassas referências bibliográficas existentes a este respeito, em nosso meio, têm-se na presente investigação, alguns dados obtidos através da lisotipia Vi, em amostras de *Salmonella typhi*, oriundas de várias localidades do Estado de S. Paulo. Afim de ampliar os resultados da fagotipagem, fez-se concomitantemente a determinação dos tipos fermentativos, diante da arabinose e xilose.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 201 amostras de *Salmonella typhi*, isoladas a partir de hemoculturas, efetuadas no período de 1966 a 1971, no Laboratório de Enterobactérias do Instituto Adolfo Lutz, S.Paulo.

Em apenas 108 culturas foi possível obter as localizações dos endereços dos doentes, registrando-se que 66 amostras originaram-se de casos de febre tifóide, ocorridos no Município de S.Paulo e 42 resultaram de cidades ou lo-

gradouros do interior do Estado.

Cumprido salientar que, antecedendo a lisotipia, as amostras foram semeadas em placas contendo ágar nutriente^(*) com finalidade precípua de selecionar as colônias tipicamente possuidoras de antígeno Vi, de acordo com a técnica da iluminação oblíqua, descrita por NICOLLE, JUDE & LE MINOR¹⁸ e LANDY¹⁵ Para maior segurança, fez-se a confirmação da presença desta fração antigênica nas culturas isoladas, pela aglutinação em lâmina, com os soro-somáticos "9" e "Vi".

Na execução da lisotipia ou fagotipagem Vi, com a respectiva leitura e interpretação dos resultados, adotamos a técnica recomendada por CRAIGIE & FELIX⁶ com as devidas anotações introduzidas por ANDERSON & WILLIAMS¹. Para tal finalidade, foram utilizadas 60 preparações adaptadas do bacteriófago Vi II, fornecidas pelo Centro Internacional de Tipagem Fágica de Enterobacteriaceae, Colindale, Inglaterra. Foram ainda incluídos os fagos não adaptados Vi I, IV e VII, sendo, este último, elemento básico na lisotipia complementar de amostras do lisotipo E 1, segundo BRANDIS².

Para a investigação da atividade fermentativa das amostras, diante da arabinose e xilose, utilizamos, como meio básico, a água peptonada a 1%, em pH 7,0, acrescida de 1% dos carbo-hidratos e 1% de indicador de Andrade. Como processo de esterilização empregou-se a filtração em Seitz, distribuindo-se assepticamente em volumes de 2 a 3 ml, em tubos. A leitura da presença ou ausência da fermentação foi efetuada após incubação a 37°C durante 24 horas.

RESULTADOS

Para uma melhor apreciação epidemiológica foram associados os resultados da lisotipia à classificação bioquímica, distribuindo-se em várias tabelas, tendo como referência básica os diferentes períodos de isolamento das 201 amostras.

Assim sendo, em 1966 foram analisadas 18 culturas, cujo comportamento, nas provas executadas, evidenciou os seguintes dados (quadro I):

(*) Difco

QUADRO I
Frequência dos lisotipos e tipos fermentativos de amostras de S. typhi isoladas em 1966

Tipos Fermentativos	Lisotipos		Não Tipáveis	Total
	E 1 a	A		
I	10	3	—	13
II	—	3	2	5
Total	10	6	2	18

Com as 24 amostras, referentes a 1967, obteve-se a seguinte distribuição, inclusa no quadro II.

Em 1968, foram coligidos dados de 53

amostras, cuja frequência de lisotipos e biotipos está discriminada no quadro III.

Foram registrados os seguintes resultados para as 33 amostras de 1969, apontados no quadro IV.

QUADRO II

Lisotipos e tipos fermentativos de amostras de S. typhi ocorrentes em 1967

Tipos Fermentativos	Lisotipos								Vi- Negativas	Total
	A	D1	E 1 a	E 1 b	F1	G1	T	I+IV		
I	5	—	8	1	3	1	1	1	1	21
II	—	1	—	1	—	—	—	—	—	2
III	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1
Total	5	1	8	2	3	2	1	1	1	24

QUADRO III

Distribuição de lisotipos e tipos bioquímicos das amostras de S. typhi, isoladas em 1968

Tipos Fermentativos	Lisotipos									Não tipáveis	Vi- negativas	Total
	A	E 1 a	E 1 b	F1	F2	G1	T	38	I+IV			
I	8	17	2	4	—	2	1	1	2	3	—	40
II	2	1	—	—	1	—	3	—	1	—	5	13
Total	10	18	2	4	1	2	4	1	3	3	5	53

QUADRO IV

Lisotipos e tipos fermentativos das amostras de S.typhi isoladas em 1969

Tipos Fermentativos	Lisotipos						Não Tipáveis	Total
	A	E 1 a	B2	F1	L1	38		
I	1	5	1	1	–	–	–	8
II	16	1	–	1	2	3	2	25
Total	17	6	1	2	2	3	2	33

QUADRO V

Lisotipos e tipos fermentativos de amostras de S.typhi isoladas em 1970

Tipos Fermentativos	Lisotipos						Não Tipáveis	Vi-neg.	Total
	A	B2	E 1 a	F1	L1	I+IV			
I	1	–	9	2	–	–	–	1	13
II	30	–	–	–	6	3	1	4	44
III	–	1	–	–	–	–	–	–	1
Total	31	1	9	2	6	3	1	5	58

QUADRO VI

Lisotipos e tipos fermentativos de amostras de S. typhi ocorrentes em 1971

Tipos Fermentativos	Lisotipos					Vi-neg.	Total
	A	E 1 a	F1	L1	38		
I	2	4	1	–	–	–	7
II	5	–	–	1	1	1	8
Total	7	4	1	1	1	1	15

Com referência às 58 culturas, representando o ano de 1970, a lisotipia e a classificação bioquímica revelaram a seguinte distribuição, como indica o quadro V. Finalmente o quadro VI evidencia os aspectos das 15 amostras isoladas em 1971.

Considerando individualmente os resulta-

dos verificados através da caracterização fágica Vi e da classificação bioquímica, segundo Kristensen, têm-se as seguintes frequências, pela disposição cronológica dos isolamentos, como estão assinalados nos quadros VII a VIII:

QUADRO VII

Frequência dos lisotipos de amostras de *S.typhi* durante o período de 1966–1971

Anos	Lisotipos												Não tipáveis	Vi-neg.	Total	
	A	B2	D1	E1a	E1b	F1	F2	G1	L1	T	38	I+IV				
1966	6	—	—	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	18
1967	5	—	1	8	2	3	—	2	—	1	—	1	—	—	1	24
1968	10	—	—	18	2	4	1	2	—	4	1	3	3	3	5	53
1969	17	1	—	6	—	2	—	—	—	2	—	3	—	2	—	33
1970	31	1	—	9	—	2	—	—	—	6	—	—	3	1	5	58
1971	7	—	—	4	—	1	—	—	—	1	—	1	—	—	1	15
Total	Nº	76	2	1	55	4	12	1	4	9	5	5	7	8	12	201
	%	37,81	0,99	0,49	27,36	1,99	5,97	0,49	1,99	4,47	2,48	2,48	3,48	3,98	5,97	99,98

QUADRO VIII

Distribuição dos tipos fermentativos em 201 amostras de *S. typhi*

Anos	Tipos Fermentativos			Total	
	I	II	III		
1966	13	5	—	18	
1967	21	2	1	24	
1968	40	13	—	53	
1969	8	25	—	33	
1970	13	44	1	58	
1971	7	8	—	15	
Total	Nº	102	97	2	205
	%	50,74	48,25	0,98	99,98

Seguindo o esquema de NICOLLE *et alii*²⁰ para a representação dos resultados na denominada fórmula de lisotipia, determinada pela frequência percentual decrescente dos lisotipos encontrados em uma região, anotamos para as 201 amostras, baseados nos resultados discriminados no quadro VIII, a seguinte configuração:

1. *Lisotipos comuns*, cuja soma dos percentuais totaliza aproximadamente 90%: A (37,81%); E 1 a (27,36%); F 1 (5,97%); Vi-negativas (5,97%); L 1 (4,47%); não tipáveis (3,98%) e I + IV (3,48%);

2. *Lisotipos pouco freqüentes* definidos como sendo todos aqueles que revelaram, isoladamente, percentagem igual ou próximo a 1% e cuja soma com a dos lisotipos comuns venha a atingir cifra em torno de 99%: T (2,48%); 38 (2,48%); E 1b (1,99%) e G1 (1,99%);

3. *Lisotipos raros*, cuja percentagem não ultrapassa de 1%: B₂ (0,99%); D1 (0,49%) e F2 (0,49%).

No que tange às 108 amostras em que se teve possibilidade de averiguar os paradiros dos doentes, fez-se uma distribuição dos lisotipos e tipos fermentativos, reconhecidos segundo as origens (município de São Paulo e cidades do interior), constando estas especificações nos quadros IX e X.

Analisando os resultados obtidos e catalogados nos diferentes quadros, destaca-se de modo insofismável a maior incidência dos lisotipos A e E 1 a, presentes em todo o período do levantamento. Denota-se que durante a eta-

QUADRO IX

Incidência de lisotipos de S. typhi no município de São Paulo e cidades do interior do Estado

	Lisotipos										Não tipáveis	Vi-neg.	Total
	A	D1	E1a	F1	F2	G1	L1	T	38	I+IV			
Capital	25	1	16	6	1	2	6	1	—	3	3	2	66
Interior	14	—	17	3	—	—	—	2	2	1	2	1	42
Total	39	1	33	9	1	2	6	3	2	4	5	3	108

QUADRO X

Tipos fermentativos de amostras de bacilos típicos da capital e do interior do Estado de São Paulo

Origem	Tipos Fermentativos		Total
	I	II	
Capital	29	37	66
Interior	25	17	42
Total	54	54	108

pa de 1966 a 1968, as amostras do lisotipo E 1 a predominaram sobre as do tipo A e fenômeno inverso foi observado no período de 1969 a 1971. Aliás este fato tem uma íntima relação com os resultados encontrados na classificação bioquímica, uma vez que, no primeiro período, notou-se acentuada sobrepujança do biotipo I sobre o tipo II, reservando, para este último tipo, predominância na fase de 1969 – 1971.

Uma tentativa de explicação para este fenômeno se baseará na premissa de que a totalidade das amostras do lisotipo A situa-se, na classificação de Kristensen, no biotipo II, e de modo idêntico, porém inverso, verifica-se que as amostras do lisotipo E 1 a apresentam acentuada capacidade de fermentar a xilose, característica do biotipo I.

Através da inspeção dos quadros IX e X, observamos naquelas amostras, cujas origens eram conhecidas, alguns aspectos epidemiológicos de grande interesse, como a prevalência do lisotipo A sobre o tipo E 1 a, nas culturas do município de S.Paulo e,

em contraposição, dominância do tipo E 1 a, para aquelas provenientes do interior.

Assinala-se ainda, em relação aos resultados na lisotipia, a ocorrência circunscrita ao município de S.Paulo, dos lisotipos D1, G1, L1 e F2. Em relação ao tipo L1, foi inicialmente detectado em 1969, de um caso ocorrido no bairro de Pinheiros, sendo evidenciadas posteriormente, no período de setembro a dezembro de 1970, outras quatro amostras, tendo no entanto, proveniência de outra área da cidade de S.Paulo (bairro Ipiranga). Curiosamente, todas as amostras deste tipo fágico comportaram-se bioquimicamente de modo homogêneo, tendo sido classificadas no biotipo II, dando inclusive ensejo de advogar a hipótese de que uma fonte de infecção comum, ou uma mesma via de transmissão, ou ambas estiveram presentes na veiculação deste lisotipo, na cidade de S.Paulo.

Na investigação do comportamento bioquímico das amostras de origens definidas, observa-se uma preponderância do biotipo II sobre o tipo I, quando provenientes da capital. Em contraste, as culturas oriundas das cidades do interior, revelaram predomínio do tipo I.

Em apenas duas oportunidades, o lisotipo B2 foi reconhecido neste levantamento, apresentando a particularidade de pertencer ao raro tipo bioquímico III.

Outro aspecto a ser destacado refere-se à presença do lisotipo E 1 b, até então de ocorrência limitada a determinados países da Europa Central.

DISCUSSÃO

A caracterização fágica em diferentes tipos que constituem o sorotipo de *S.typhi*, por meio da lisotipia Vi, representa sem dúvida alguma, o método fundamental de análise para a investigação epidemiológica da febre tifóide. Recorrendo-se a este processo, tanto em situações endêmicas como epidêmicas, será possível na maioria das vezes identificar a presença de um ou vários lisotipos de *S.typhi*, envolvidos nestas condições epidemiológicas. Capacita, ainda, revelar a introdução de tipos até então inexistentes nesta área e, como ponto capital, visa estabelecer uma frequência dos vários lisotipos prevalentes na região considerada ¹⁷.

Graças à utilização desta técnica, tem-se atualmente patenteados a existência de uma distribuição geográfica variável na maior parte do mundo. Encontramos um determinado número de lisotipos que têm generalizada repartição nos vários continentes, dando ensejo de classificá-los nos chamados tipos cosmopolitas, tendo como representantes os lisotipos A, E1, C1, D1, F1, N e T., e outros. De ocorrência restrita a determinadas regiões, como se observa com o tipo G1, freqüente nas áreas ribeirinhas ao Golfo Pérsico, no Oriente Médio, e em algumas regiões da África e extremo Oriente, excepcionalmente ocorre na Europa e continente americano; o lisotipo M1, predomina no extremo Oriente e na costa ocidental da América do Sul (Chile, Perú e Equador); os tipos L1 e L2, têm localização nas áreas endêmicas do norte da África, principalmente Marrocos; o lisotipo B3, em Portugal, e podem citar-se inúmeros outros exemplos característicos de localizações de determinados tipos fágicos ¹⁹.

Analisando os levantamentos neste sentido elaborados, não se poderão olvidar os trabalhos de NICOLLE & HAMON ¹⁶ e NICOLLE *et alii* ²⁰ que estudaram o problema da distribuição geográfica dos lisotipos em 1369 amostras de *S.typhi*, oriundas da Argentina, Uruguai, Chile, Peru, Equador, Venezuela e Guianas Holandesa e Francesa. Verificaram no cômputo geral a predominância do lisotipo E 1,

seguido dos tipos A, 46, M 1, F 1, D 1, N, 38 e I+IV. Em todos os países banhados pelo Oceano Pacífico, encontraram maior incidência do tipo M 1, além da destacada prevalência do lisotipo 46, acentuadamente em todas as áreas de influência da colonização ibérica. Aliás, advogam estes pesquisadores que, com grande probabilidade, este lisotipo é de origem sul-americano, implantando-se após no continente europeu, em particular na Espanha.

Em regiões ou países da América do Sul, que não tiveram influência tão evidente deste elemento colonizador, como por exemplo, as Guianas e o Brasil, o achado deste lisotipo é excepcional ou mesmo desconhecido.

Outro aspecto, realmente interessante, refere-se à ausência, até o momento, do lisotipo M 1, principalmente nesta investigação, mesmo considerando que a população do estado de S. Paulo está integrada de um número significativo de indivíduos de origem asiática, admissível para explicar sua ocorrência. Talvez, no presente levantamento, a inexistência de amostras deste lisotipo seja decorrente de que as culturas analisadas provieram de áreas com ausência ou minoria de elementos portadores desta origem.

Cotejando as várias fórmulas de lisotipia apresentadas por NICOLLE *et alii* ²⁰, encontramos para a frequência percentual dos lisotipos de S.Paulo uma certa similaridade com as fórmulas de alguns países europeus e, acima de tudo, com aquelas assinaladas para a África, em cujas regiões oscilam preponderantemente os lisotipos A e E 1. No entanto, como ponto divergente para a lisotipia destas áreas, podemos enfocar a ausência do lisotipo C 1.

Estabelecendo um confronto com os resultados encontrados por HOFER ^{10, 11, 12} no estado da Guanabara, verifica-se a coalização dos tipos mais freqüentes, tendo porém uma maior contigüidade de percentuais entre os lisotipos A e E1a, nas amostras do estado de S.Paulo.

A pluralidade de lisotipos defrontados neste inquérito, inclusive a ocorrência de tipos considerados raros ou exóticos para a América do Sul, como no caso de L 1, G 1, E 1 b, e F2, atesta bem a relevância da fagotipagem, princi-

palmente em países como o nosso, de vasta extensão territorial e com o envolvimento de múltiplos fatores étnicos, facilitando à febre tifóide manter-se inalterável sob a forma endêmica, atingindo desde o meio rural até as grandes metrópoles, como a cidade de S.Paulo. Como hipótese para tornar mais explícito este acontecimento, deve-se admitir como fundamental o problema do crescimento populacional vertiginoso desta região, albergando um grande afluxo de pessoas, provenientes de correntes migratórias internas e externas, implantando-se em uma área com precariedade de saneamento básico.

Quanto ao comportamento bioquímico, diante da arabinose e xilose destas amostras, registraram-se achados dissonantes de outras investigações anteriormente realizadas.

A primeira referência nacional coube a PESTANA²¹ que, estudando este aspecto em 304 culturas, isoladas no Estado de S.Paulo, verificou que 76,6% das amostras pertenciam ao biotipo I e 23,3%, ao tipo II. O maior contingente de amostras provieram da capital do estado, assinalando, como detalhe nos resultados, que a freqüência do tipo II foi proporcionalmente mais elevada nas amostras oriundas do interior.

Em 1955, COSTA, ALMEIDA & SILVA³ analisando 17 amostras, registraram uma destacada predominância do tipo I (94,1%) em relação ao tipo II (5,8%).

Se na presente investigação considerarmos apenas as 95 amostras isoladas no período de 1966 a 1968, verifica-se que as freqüências dos tipos bioquímicos praticamente são idênticas às referidas por Pestana. Em contraposição, na segunda etapa referente a 1969-1971, tem-se uma acentuada dominância de amostras classificadas no biotipo II.

Cabe ainda salientar que nos levantamentos anteriores, em nenhuma oportunidade foram anotadas culturas pertencentes ao tipo III, cuja ocorrência na presente investigação, foi de caráter esporádico, nos anos de 1967 e 1970.

Estes resultados não são ainda capazes de estabelecer uma configuração epidemiológica definitiva da distribuição dos tipos de *S.typhi* ocorrentes no Estado de São Paulo, em virtu-

de de não abranger todas as áreas endêmicas, que provavelmente revelarão outros aspectos até então não figurados. Um exemplo, que muito bem caracteriza esta afirmação, refere-se aos resultados encontrados por um de nós, (E.H.) em 50 amostras de *S.typhi*, isoladas no Município de Ribeirão Preto, identificadas como lisotipos A e T e todas pertencendo ao tipo bioquímico II.

Diante dos resultados observados, principalmente sob o aspecto da caracterização fágica, não nos cabe emitir outra apreciação senão a de ratificar a multiplicidade das possíveis fontes de infecção de *Salmonella typhi*, existentes no Estado de São Paulo, decorrentes com toda probabilidade de portadores oriundos das mais variadas regiões.

RESUMO

HOFER, E.; NOVAES, J.R.C. & PESSOA, G.V.A. — Lisotipos e tipos fermentativos de *Salmonella typhi* isoladas no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 7-15, 1972.

Na presente investigação, os autores analisaram a distribuição de lisotipos e tipos fermentativos em 201 amostras de *Salmonella typhi*, isoladas no estado de São Paulo, no período de 1966 a 1971.

Obtiveram, no cômputo geral, a prevalência dos lisotipos A (37,81%), E I a (27,36%) e F I (5,97%) amostras Vi-negativas, (5,97%) e L I (4,47%).

Em relação à classificação bioquímica, 50,74% das amostras pertenceram ao tipo I, 48,25% ao tipo II e 0,99% ao tipo III, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, E.S. & WILLIAMS, R.E.O. — Bacteriophage typing of enteric pathogens and staphylococci and its use in epidemiology. *J. Clin. Path.*, 9: 94-127, 1956.
2. BRANDIS, H — Zur Unterteilung des Typhusbakterientypes E I. *Zentbl. Bakt. ParasitKde (Orig.)*, 162: 223-224, 1955.

3. COSTA, G.A.; ALMEIDA, W.A. & SILVA, N.P.M. — Tipos fermentativos do bacilo tífico. *Mems Inst. Oswaldo Cruz*, 53: 115-120, 1955.
4. CRAIGIE, J. & BRANDON, K.F. — Bacteriophage specific for the O-resistant V form of *B. typhosus*. *J. Path. Bact.*, 43(2): 233-248, 1936.
5. CRAIGIE, J. & BRANDON, K.F. — The laboratory identification of the V form of *B. typhosus*. *Can. Publ. Hlth J.*, 27: 165-170, 1936.
6. CRAIGIE, J. & FELIX, A. — Typing of typhoid bacilli with Vi bacteriophage. *Lancet*, 252: 823-827, 1947.
7. CRAIGIE, J. & YEN, C.H. — Demonstration of types of *B. typhosus* by means of preparations of type II Vi phage. Principles and techniques. *Can. Publ. Hlth J.*, 29: 448-463, 1938.
8. CRAIGIE, J. & YEN, C.H. — Demonstration of types of *B. typhosus* by means of preparations of type II Vi phage. Stability and epidemiological significance of V form type of *B. typhosus*. *Can. Publ. Hlth J.* 29:484-496, 1938.
9. FELIX, A. & PITT, R.M. — A new antigen of *B. typhosus*. Its relation to virulence and to active and passive immunisation. *Lancet*, 227: 186-191, 1934.
10. HOFER, E. & NOVAES, J.R.C. — Lisotipos e tipos fermentativos de *Salmonella typhi* isoladas no Estado de São Paulo. [Apresentado ao 3º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Belo Horizonte, 1971].
11. HOFER, E. & VICENTE, M.M.A. — Caracterização bioquímica de lisotipos de *Salmonella typhi*, isoladas no Estado da Guanabara. *An. Microbiol.*, 16: 283, 1969.
12. HOFER, E. & VICENTE, M.M.A. — Lisotipia Vi e classificação bioquímica de amostras de *Salmonella typhi* isoladas no Estado da Guanabara. *Mems Inst. Oswaldo Cruz*, 1972. [No prelo].
13. KRISTENSEN, M. — Studies on the type division of the typhoid and paratyphoid B bacilli by fermentations. *J. Hyg. (Camb)* 38(6): 688-701, 1938.
14. KRISTENSEN, M. & HENRIKSEN, H.C.D. — Reactions fermentatives du bacille typhique et leur rôle épidémiologique. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 3: 551-582, 1926.
15. LANDY, M. — The visual identification of V and W form colonies in *Salmonella* cultures. *Publ. Hlth Rep.*, (Wash.), 65: 950-951, 1950.
16. NICOLLE, P. & HAMON, Y. — Distribution des lysotypes du bacille typhique et du bacille paratyphique en France, dans les territoires d'outre-mer et dans quelques autres pays. *Revue Hyg. Méd. Soc.*, 2: 424-463, 1954.
17. NICOLLE, P.; HAMON, Y. & EDLINGER, E. — Aspects théoriques et pratiques de la lysotypie des bacilles typhiques et paratyphiques B. *Biologie Méd.*, 42: 437-518, 1953.
18. NICOLLE, P.; JUDE, A. & Le MINOR, L. — Relation entre l'intensité de l'irisation présentée para certaines colonies de *Salmonella* et leur constitution antigénique. *Annls Inst. Pasteur (Paris)*, 78 : 572-582, 1950.
19. NICOLLE, P.; PRUNET, J.; DIVERNEAU, G.; PLESSIS, A.M. & KLEIN, B. — Les lysotypes exotiques du bacille typhique. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 58(4): 695-714, 1965.
20. NICOLLE, P.; VIEU, J.F.; DIVERNEAU, G.; BRAULT, J. & KLEIN, B. — Utilisation en épidémiologie typhoïdique de la diversité des bacilles typhique. II. Distribution géographique des lysotypes de *Salmonella typhi*. *Bull. Acad. Natn. Méd.*, 154: 481-487, 1970.
21. PESTANA, B.R. — Tipos de bacilos tíficos e seu valor epidemiológico. *Anais Paul. Méd. Cirurg.*, 34(1): 19-25, 1940.
22. SCHOLTENS, R. TH. — The resistance developed against bacteriophage. *J. Hyg. (Camb.)*, 36: 452-455, 1936.
23. SERTIC, V. & BOULGAKOV, N.A. — Sur le sensibilité des souches d'*Eberthella typhi* bactériophage, en relation avec les caractères antigéniques. *C.R.Séanc. Soc. Biol.*, 122: 35-37, 1936.

REAÇÃO DE FIXAÇÃO EM SUPERFÍCIE COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA FEBRE TIFÓIDE (1)

USE OF SURFACE FIXATION IN THE LABORATORIAL DIAGNOSIS OF TYPHOID FEVER

CELSO SOARES HABERBECK BRANDÃO (2)

SUMMARY

BRANDÃO, C.H.B. — Use of surface fixation in the laboratorial diagnosis of typhoid fever. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 17-35, 1972.

Sera from 100 patients of typhoid fever had been tested by means of the surface fixation and of the Widal test using somatic and flagelar antigens, in comparison with the results of hemocultures.

There was strict accordance between the results obtained through the hemoculture and the surface fixation reaction, while, for the same sera, the Widal test showed negative results in 18 cases where the somatic antigen was used and in 24 cases where the flagelar antigen was used.

In 200 sera of patients with clinical and laboratorial diagnosis of infectious diseases other than typhoid fever, the surface fixation reaction showed always negative results; the Widal test using somatic antigen was positive in 52% of the cases and when the flagelar antigen was used the results were positive in 14,5% of the cases.

The adoption of the surface fixation reaction is suggested for the laboratorial diagnosis of the typhoid fever due to its greater sensibility and specificity.

1. INTRODUÇÃO

O diagnóstico da Febre Tifóide em nosso meio continua sendo um dos problemas que os laboratórios de Saúde Pública têm de enfrentar. Em 1969, o Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, foi solicitado a elucidar 1129 casos suspeitos de febre tifóide, revelando 85 casos positivos por hemocultura e muitos outros pela reação de Widal. Em 1970, maiores ainda foram as solicitações, 1717 casos, dos quais 192 foram confirmados por hemocultura e muitos outros, também, pela reação de Widal. Tratando-se de meio onde as condi-

ções epidemiológicas, tanto na Capital quanto no Interior, são ainda precárias, justificam-se, pois, as cautelas habituais de nossos clínicos, lembrando-se da febre tifóide toda vez que deparam com casos de doença febril de etiologia obscura. A natureza septicêmica de doença, determinando abundância de sintomas, bem como o fato incontestado da sua existência endêmica no Estado de São Paulo, levam muitos clínicos a solicitarem a ajuda do laboratório para esclarecimento do diagnóstico.

Baseia-se o diagnóstico de laboratório de febre tifóide no isolamento e identificação do agente infeccioso — *Salmonella typhi* — ou na

(1) Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos para obtenção do título de Doutor em Ciências — Microbiologia e Imunologia, São José dos Campos, SP., 1971.

(2) Professor Assistente da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, S.P.

verificação, no sangue dos pacientes, de anticorpos específicos para o bacilo tífico. O ideal seria o isolamento e identificação do agente infeccioso o que nem sempre é possível uma vez que o germe, em certas fases da doença, desaparece da corrente sanguínea ou, como hoje em dia é freqüente, o paciente é precocemente medicado com agentes antimicrobianos.

Fica, portanto, reservada ao diagnóstico sorológico uma função muito importante e, uma vez utilizado em condições adequadas, é de grande valia na orientação diagnóstica.

De todas as provas sorológicas, descritas até hoje para diagnóstico da infecção tífica, somente a reação de aglutinação — reação de Widal — tem sido largamente usada. Mas, embora seja um bom meio diagnóstico, apresenta falhas e, portanto, seria de grande significação, para evidencição rápida da febre tifóide, o estudo de outra reação sorológica que satisfizesse os objetivos colimados — sensibilidade, especificidade, rapidez de execução e modicidade de custo — que nos propuzemos a fazer e é o assunto do presente trabalho: *estudo da reação de fixação em superfície de Castañeda, como método diagnóstico da febre tifóide, em confronto com hemocultura e reação de Widal.*

2. HISTÓRICO

2.1 Generalidades

Não há negar que a propriedade de certos soros, provenientes de animais, de se mostrarem capazes de promover “in vitro” a aglomeração dos germes inoculados foi evidenciada pela primeira vez por CHARRIN & ROGER⁵, quando pesquisavam a “ação dos humores sanguíneos, não só sobre a vitalidade, como também no que respeita às diversas propriedades dos micróbios”. Esse trabalho dos citados autores revelou, na realidade, o fenômeno da “aglutinação”, que “consistia na aglomeração dos micróbios em ajuntamentos ou grumos mais ou menos volumosos”. Embora tivessem descrito o fenômeno com notável exatidão, não se preocuparam em denominar essa propriedade, observada nos soros

de animais vacinados com *Pseudomonas aeruginosa*

Coube a GRUBER¹³ qualificá-la de “aglutinina” e, com efeito, deve-se a esse autor a demonstração de que soros de indivíduos convalescentes de febre tifóide continham tais anticorpos, pois com aqueles era possível aglutinar *Salmonella typhi*. Note-se, porém, que GRUBER & DURHAN¹⁴ diziam que as aglutininas antitíficas eram encontradas em indivíduos “que conseguiam sobreviver à infecção tífica”, nada acrescentando sobre a possibilidade de as referidas aglutininas existirem no soro dos que ainda estavam em pleno período de infecção.

Evidencia-se, pois, o mérito de WIDAL³⁶ ao demonstrar que os anticorpos aglutinantes do bacilo tífico podiam ser encontrados no sangue dos pacientes até mesmo no terceiro dia da doença, servindo, portanto, não apenas como evidência da imunidade, como referiam Gruber & Durhan, mas, seguramente, como prova de infecção.³³ O próprio Widal, de parceria com Sicard³³ esmiuçou devidamente o assunto — distinção entre “reação de imunização” e “reação de infecção” — esclarecendo com precisão a diferença que entendia existir entre um e outro conceitos³⁴.

Evidentemente, o “sorodiagnóstico de Widal” é prova sorológica em que agem as aglutininas tíficas, assim como são aglutininas os anticorpos que revelam um passado de febre tifóide; Widal, contudo, insistia neste ponto, que é capital: “o sorodiagnóstico evidencia infecção e não imunidade”. Aliás, é por assim pensar que médicos e sanitaristas solicitam do laboratório o auxílio da reação de Widal, quando suspeitam de infecção pelo bacilo tífico. Sem pretender entrar, agora, no mérito da questão, cumpre-nos assinalar que, decorridos quase oitenta anos de sua ininterrupta aplicação, tinha WIDAL³⁷ razão quando proclamava: “É mostrando que o fenômeno existe, não apenas no soro de indivíduos tornados refratários à febre tifóide, mas nos soros dos enfermos em plena evolução, que o sorodiagnóstico se transforma num processo de ex-

ploração clínica, permitindo o diagnóstico da doença”.

Com referência a nosso meio, embora o “Brazil Médico”, em 22 de setembro de 1896, na página 322, transcrevesse quase na íntegra a comunicação de Widal à Sociedade Médica dos Hospitais (Paris), datada de 26 de junho desse ano, não conseguimos apurar, com certeza, quem tenha sido o pioneiro da aplicação do sorodiagnóstico no Brasil. A primeira referência ao sorodiagnóstico de Widal, realizado por autor brasileiro, encontramos-na no ano seguinte, quando no “Brazil Médico”, de 8 de julho de 1897, Puppig e Ottoni inseriram um trabalho denominado “Da aglutinação como meio diagnóstico do bacilo tífico”, redigido em português, mas que fora realizado no Instituto de Higiene Experimental de Montevideo, Uruguay, declarando-se o segundo dos autores preparador da cadeira de Histologia Normal da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro.

Nada estranhável essa demora na aplicação da reação de Widal, porquanto perduravam dúvidas, até então, quanto à existência, no Brasil, da febre tifóide como entidade mórbida, embora, já em 1894, Lutz²¹, após ingentes esforços, houvesse demonstrado, pelo isolamento e identificação da *Salmonella typhi*, que as chamadas “febres paulistas” nada mais eram que febre tifóide, o que provava, de vez, a existência endêmica da doença em nosso meio. É natural, pois, que só a partir de então a reação de Widal passasse a ser solicitada como método propedêutico indispensável à elucidação de doenças febris com antecedentes suspeitos.

2.2 A reação de Widal

A reação de Widal, originariamente, realizava-se com germes vivos: num tubo de ensaio, a 10 gotas de cultura jovem, suficientemente rica em germes, adicionava-se uma gota do soro suspeito. Podia a proporção cultura/soro reduzir-se a 1:5, com resultados semelhantes.

Para Widal, citado por DIEULAFOY⁶, o importante residia na juventude da cultura, pois, dizia ele: “L’usage d’une culture jeune, datant d’un ou deux jours, est preferable. Je

dirai même que si le développement d’une culture est suffisamment riche, *plus elle est jeune, meilleure elle est*” (grifo do autor). Como cuidado especial, recomendava Widal que a mistura fosse mantida em repouso, durante 15 a 30 minutos, para formação dos grumos; a seguir, uma gota da mistura era colocada em lâmina de vidro e examinada ao microscópio.

Como se vê, o método era extremamente rápido, donde a denominação de “extemporâneo”; que lhe deu Widal. Havendo dúvidas quanto ao aspecto dos aglutinados, isto é, se persistisse a presença de bacilos móveis ou isolados, ou se os aglutinados, apesar de evidentes, não se mostrassem muito confluentes, Widal renovava a leitura passadas algumas horas, primeiro com vista desarmada e depois com o auxílio de microscópio, firmando o diagnóstico se os aglutinados apresentassem o aspecto de “ilhotas de um arquipélago”. No caso de resultado negativo com persistência dos sintomas suspeitos, reiterava o exame seguidamente, durante vários dias. Assinala esse autor ter encontrado reações positivas tão precocemente como no terceiro dia de doença e bastante freqüentes no quinto e sétimo dias da infecção.

Entretanto, como é de se ver, o uso de germes vivos, além de constituir-se em sério perigo para os laboratoristas, acarretava uma série de inconvenientes quando a reação devia aplicar-se em grande número de doentes e, ainda mais, limitava sua aplicação a laboratórios especializados. A remoção dessa dificuldade é atribuída por ZINSSER³⁸ a Neisser, cuja idéia de empregar emulsões de bacilos tíficos mortos pelo formol resolveria de vez o problema do antígeno, já que se tornaria possível executar o sorodiagnóstico sem maiores entraves. No entanto, em que pese à opinião de Zinsser, há que ponderar que, bem antes de Neisser, já em 1897, WIDAL³⁵ sugeria a adoção de antígeno constituído por germes mortos pelo formol, assim se expressando—“A reação aglutinante sobre os bacilos mortos não é reação vital por parte dos micróbios; ela mais parece ser uma reação passiva por parte da substância protoplasmática” — e recomendando usassem-se germes mortos pelo formol

na proporção de “uma gota de formol comercial para 150 gotas de cultura”. Acrescentava ainda — “Essa emulsão conserva-se bem por 5 meses, em armário de laboratório, com sensibilidade fixa, servindo admiravelmente para medir poder aglutinante do soro de um mesmo doente, durante várias semanas”. Apenas para os casos de aglutinação fraca ou duvidosa, julgava Widal indispensável recorrer à “contra-prova, realizada com cultura viva e rejuvenecida”.

Também, no laboratório de bacteriologia médica da Universidade de Copenhagem, DREYER⁷ recomendava o emprego de emulsões de bacilos tífcos mortos pelo formol a 1% e distribuía-as a quem as solicitasse.

O achado de Weil e Felix (FELIX⁸) em que o *Proteus* e outros germes, inclusive os bacilos tífcos e paratíficos, possuíam dois tipos de antígenos — somáticos e flagelares — designados “O” e “H” respectivamente, introduziu um novo problema na reação de Widal, tornando-se necessário substituir a técnica clássica pela aglutinação qualitativa de FELIX⁹, hoje vigente em todos os laboratórios. Essa modificação, contudo, alterou sua interpretação, até então bem simples. Com efeito, já não basta que o soro de um indivíduo suspeito clinicamente de febre tifóide aglutine uma suspensão de bacilos mortos ou vivos; torna-se necessário saber quais os títulos das aglutininas somáticas e flagelares existentes no soro.

Conseqüentemente, a interpretação da reação de Widal nos novos moldes depende do conhecimento da distribuição das aglutininas “O” e “H” na população local, para avaliar-se de sua significação, assim como para permitir a distinção entre reações positivas, decorrentes de infecção, e reações de vacinação.

Com referência a esses dois pontos capitais da avaliação da reação de Widal, parece-nos importante referir observações relativas ao nosso meio ambiente.

LEME & CARRIJO¹⁹, pesquisando aglutininas somáticas e flagelares em 321 indivíduos internados no Hospital do Juquerí, sem passado de vacinação TAB ou de infecção tífica, verificaram, para as primeiras, títulos de 1:20 em 18,69% dos casos, 1:40 em apenas 4,36% e, para as segundas, 1:20 em 7,78% e 1:40 em 5,29%; quanto a título mais elevado, encontraram apenas um caso com ambas as aglutininas a 1:80 (0,34%).

AMARAL & LACERDA JR.¹ dosaram as aglutininas “O” de 123 doentes mentais, internados no Hospital do Juquerí, encontrando 4 indivíduos com título de aglutininas “O” de 1:80 e, com títulos superiores, apenas um, com taxa de 1:640; não pesquisaram anticorpos anti — “H”.

TAUNAY³¹, verificando o teor de aglutininas “O” e “H” em pessoas aparentemente sadias, residentes no município de São Paulo, encontrou a seguinte distribuição:

Aglutininas	Indivíduos examinados	Títulos (recíprocas)					
		< 50	50	100	200	400	800
“O”	Número	833	99	35	13	4	1
	%	89,4	10,6	3,8	1,4	0,4	0,1
“H”	Número	900	32	13	3	1	0
	%	96,6	3,4	4,4	0,3	0,1	0

A análise dos dados referidos por esses autores revela que os títulos de aglutininas considerados entre nós como significativos de infecção tífica¹⁷ isto é, 1:100 para “O” e 1:200

para “H”, são relativamente baixos, não só no que respeita às aglutininas “H” como no que concerne à aglutinina “O”.

No que respeita ao problema do aumento

das aglutininas “O” após vacinação, CARRIJO, PIRES & BRANDÃO⁴ verificaram que, em soros de indivíduos inoculados com vacinas de boa qualidade, ou seja, nas quais o antígeno “O” não foi lesado por agentes químicos como o fenol ou sublimado, é bastante significativa a alta dos títulos aglutinantes contra esse antígeno. Assim é que, em 66 indivíduos recolhidos à Penitenciária Estadual de São Paulo, que haviam sido vacinados há dois anos ou mais, encontraram, uma semana após a terceira dose de vacinação por eles efetuada, títulos bastante elevados e em porcentagens significativas, tais como: 3 com 1:40; 13 com 1:80; 19 com 1:160; 17 com 1:320; 9 com 1:640 e 5 com 1:1280, quando antes predominavam títulos baixos, 36 com 1:20; 19 com 1:40 e 11 com 1:80.

Poderia parecer, pelo anteriormente exposto, que as aglutininas “H” se prestariam melhor para o diagnóstico de infecção suspeita de tífica, pois os respectivos títulos encontrados em pessoas normais foram muito mais baixos e em menor número que os das aglutininas “O”. Na realidade verifica-se o contrário, porquanto os anticorpos “H” podem surgir independentemente de infecção por *Salmonella typhi*, tão somente como resposta anamnésica a infecções diversas, não sendo, como concluiu FELIX¹¹, dignas de confiança para indicar a presença de uma infecção específica por bacilos típicos ou paratípicos.

Outro problema na interpretação da reação de Widal é o das reações cruzadas. Como é sobejamente conhecido, a *Salmonella typhi*, de acordo com o esquema de White e Kaufmann, pertence ao grupo D, cujos componente contém sempre o antígeno IX e muitos o antígeno XII, que pode estar presente em outras salmonelas que não do grupo D. Nessas condições, deve-se admitir que infecções por esses germes possam provocar elevação de aglutininas “O” nos soros dos pacientes, embora seja provavelmente baixa a frequência de títulos anti-“O”, devida a infecções por Salmonelas outras que não a tífica, como assinala SCHROEDER³⁰. Esse autor é muito severo na análise que faz do valor da reação de Widal como método diagnóstico de febre tifóide, concluindo que “as provas sorológicas para

diagnóstico da febre tifóide são inespecíficas, pobremente padronizadas, freqüentemente equivocantes e de difícil interpretação. Se forem usadas para diagnosticar a febre tifóide, o título de anticorpo “O” deverá ser o único de valor expressivo”.

Contestando, inclusive, o valor do anticorpo “O” como prova diagnóstica da febre tifóide, REYNOLDS *et alii*²² estudaram um caso em que a infecção por *Salmonella typhimurium* ocasionou uma elevação significativa do título das aglutininas “O”, gerando dessa forma confusão diagnóstica só resolvida com o isolamento do germe em questão.

Embora FELIX¹⁰ tenha insistentemente debatido o problema da padronização da reação de Widal, chegando até a preparar emulsões de antígenos e amostras de soros aglutinantes “O” e “H”, são raros, se não raríssimos, os laboratórios oficiais que os utilizam. Sabemos que somente na Inglaterra é que esse trabalho de Felix teve repercussão, havendo facilidade para obtenção tanto de antígenos como de soros-padrão. Em nosso meio, reina ainda grande heterogeneidade de antígenos, bem como não é usual o controle das reações por soros-padrão, o que seria de grande importância, tanto no ponto de vista diagnóstico, como para cotejamento dos resultados obtidos por pesquisadores em diferentes pontos do país. No Estado de São Paulo há que ressaltar o significado do trabalho que vem sendo desenvolvido, há muitos anos, na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, para uniformização da interpretação dos resultados e padronização dos antígenos da reação de Widal em uso na sua rede laboratorial em todo o Estado e em outros laboratórios.

2.3 Reações de precipitação

Embora KRAUS¹⁸ tenha demonstrado a possibilidade de identificar a febre tifóide mediante a evidenciação de precipitinas existentes no soro de pacientes, esse método diagnóstico não teve difusão, talvez em virtude da inespecificidade dos antígenos empregados. TULASNE & KUHLMANN³² renovaram as tentativas anteriores, passando a utilizar antígenos completos, segundo a técnica de Boivin,

de *Salmonella typhi* em fase lisa; referem julgar o processo muito bom especialmente no que respeita à possibilidade de diferenciar uma infecção tifóide de uma paratifóide. Em São Paulo, BARACCHINI² estudou o assunto, concluindo que a reação de precipitação, utilizando o antígeno de Boivin, apresenta elevada especificidade, além de permitir, em certo grau, a distinção entre anticorpos oriundos de infecção e os provenientes de vacinação TAB.

O trabalho de Baracchini, acima citado, foi único, pelo que sabemos, realizado em nosso país, não se registrando, apesar dos bons resultados referidos pelo autor, novas tentativas da utilização das precipitinas no diagnóstico da febre tifóide.

2.4 Reação de fixação em superfície

O emprego do método da denominada “aglutinação seletiva”, descrito por RUIZ CASTAÑEDA²⁸, destinado à diferenciação dos anticorpos de *Brucella melitensis* dos de *Brucella abortus*, levou seu autor à interessante observação seguinte: nas depressões hemisféricas das placas de porcelana, das que se usam para determinação de grupos sanguíneos, onde realizava a reação, as misturas de anticorpo e antígeno, este constituído por emulsões bacterianas em partes iguais de *Brucella abortus* coradas pelo azul de metileno e *Brucella melitensis* corada pela safranina O, aderiam de tal forma à superfície da placa que era necessário empregar energia para remover os anéis coloridos formados”. “Era pois”, deduziu RUIZ CASTAÑEDA²⁹, “uma fixação do complexo antígeno-anticorpo sobre a superfície da porcelana”. Prosseguindo, diz esse autor: “baseados nessa observação, passamos a colocar misturas de antígeno colorido a seu correspondente anticorpo sobre papel de filtro, submetendo este a uma corrente de solução isotônica, com a idéia de lavar a mistura por ação hidrodinâmica e mobilizar o líquido com a absorção. Observamos notável afinidade do complexo antígeno-anticorpo com o papel, contrastando com misturas de soro normal e antígeno”. Essa “fixação em superfície”, assim RUIZ CASTAÑEDA²³ denominou o fenômeno, “é instantânea como pudemos

comprovar, depositando uma gota de soro imune sobre o papel, no qual se formou um círculo de aproximadamente 2 centímetros, aplicando-se então no centro do referido círculo uma gota de antígeno colorido e imediatamente agregando-se solução salina isotônica, com uma pipeta capilar, tratando-se de forçar o antígeno a correr até a periferia. Para contraste, empregou-se soro normal como base sobre a qual depositou-se o antígeno. Enquanto que no soro negativo o antígeno foi facilmente deslocado até a periferia, no soro positivo permaneceu fixo no local onde foi colocado apesar de haver-se procedido com toda rapidez possível. Esta diferença na maneira de manifestar-se a reação antígeno-anticorpo, comparada à que sucede quando empregamos soro normal, serviu-nos de base para desenvolver o método rápido para investigar a presença de anticorpos contra *Brucella*, tifo e paratifo, *Proteus* OX19 e *Proteus* OXK”. A este interessante retrospecto do desenvolvimento da reação de fixação em superfície, segue-se, no trabalho citado, a explicação que Castañeda sugere ao mecanismo de sua descoberta: “expusemos a maneira de reagir de uma suspensão de bactérias expostas ao correspondente anticorpo em uma placa de porcelana, e de como o antígeno se fixa no papel por influência do anticorpo. No primeiro caso ocorrem fenômenos de aglutinação em que as partículas agrupadas mediante o anticorpo correm até a periferia onde aderem à porcelana. Resta por investigar a causa que determina tal aderência. No papel, o antígeno se colocou sob a forma de uma gota colorida, de maneira que, ao agregar um soro com grande proporção de anticorpos, não haverá movimento que permita aglutinações, e tão somente o antígeno manter-se-á fixo no local onde foi posto. Se no primeiro caso pode-se aceitar que, para aglutinar o antígeno, os anticorpos atuam como intermediários que ligam as bactérias umas às outras, que eventualmente se acumulam na periferia, aderindo à porcelana por contacto e dessecação, no segundo não se pode deduzir recíproca reação nas partículas antigênicas, já que o soro, ao aplicar-se sobre a mancha antigênica nada mais faz do que sujeitá-la ao papel, como se fosse uma aderência.

suficientemente ativa para impedir sua separação pela influência da corrente de solução salina. Como se pode supor, não se trata de reação em que os anticorpos atuam como amboceptor senão que o verdadeiro mecanismo da fixação tem que ocorrer entre o anticorpo e o papel. Pelo que parece, ao reagirem os anticorpos com o antígeno, este se fixará graças à aderência da globulina sobre a superfície do papel. Bem conhecida é a explicação, considerada factível, no fenómeno de união de um antígeno com o seu correspondente anticorpo e que, resumidamente, consiste em supor um movimento dos campos polares do anticorpo, os que se ajustam aos receptores do antígeno, deixando exposta a parte hidrófoba da globulina, com o que esta, ao perder sua afinidade pela água por neutralização de seus elementos polares, transforma-se em material insolúvel e, portanto, expulso do meio líquido. É evidente que, ao perder sua afinidade pelo líquido, os elementos hidrófobos expostos aderem fortemente à superfície sólida disponível, tal como ocorre sobre a placa de porcelana ou sobre o papel”.

Desde a primeira descrição do fenómeno, em 1950, procurou RUIZ CASTAÑEDA ²⁴ “aperfeiçoá-lo até convertê-lo em método prático que nos permita diagnóstico rápido das infecções que comumente se investigam pela presença de anticorpos no sangue.

Tais infecções são as tíficas e paratíficas, o tifo exantemático e a brucelose, doenças ainda freqüentes, relativamente em nosso meio .

De fato, o emprego da fixação em superfície tornou-se extremamente difundido na República Mexicana, conforme nos foi dado verificar quando freqüentamos o Instituto de Investigaciones Medicas, da cidade do México, dirigido por Castañeda, onde se prepara constantemente, grande número de papéis reativos, que se destinam ao uso nos Centros de Saúde, hospitais, laboratórios de análises clínicas e outras instituições.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Soros testados*

Foram testados, pelas reações de fixação em superfície e de Widal:

a) Cem soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura positiva para *Salmonella typhi*;

b) cinquenta soros positivos nas reações de V.D.R.L. e de Wassermann;

c) cinquenta soros positivos na reação de aglutinação para leptospiros;

d) cinquenta soros com reação de imuno-fluorescência e/ou reação de Sabin-Feldman positiva para toxoplasmose;

e) cinquenta soros com reações de aglutinação (reação de Wright), “spot-test” e fixação em superfície positivas para brucelose;

f) cento e sessenta soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura negativa;

g) trezentos e quarenta soros de pacientes cujo diagnóstico clínico final foi de moléstia febril indeterminada.

3.2 *Antígenos*

3.2.1 *Antígeno para reação de fixação em superfície*

Foi preparado como segue:

a) Em 20 tubos, de 16 X 160mm, cultivar *Salmonella typhi* O 901, em fase lisa comprovada pelas provas de aspecto de colônias em placa de ágar e inaglutinabilidade com salina e com solução aquosa de tripaflavina a 0,5%;

b) emulsionar o crescimento de cada tubo em 5ml de solução fisiológica e semear em uma garrafa de Roux com ágar ligeiramente alcalino, pH 7,4 (Tryptone-Soy-Agar*), da qual foi retirada previamente a água de condensação;

c) incubar durante 24 horas, a 37°C, com a superfície do ágar voltada para cima durante 30 minutos e, em seguida, inverter a posição da garrafa;

d) retirar o excesso de líquido e ressuspender o crescimento em 20 ml de salina, com o auxílio de 4 cilindros de vidro de aproximadamente 3 cm, que são deslocados sobre a superfície do ágar por movimentação em bácia da garrafa;

e) proceder ao exame bacterioscópico de cada garrafa;

f) juntar os crescimentos das garrafas, filtrando-os em dupla camada de gaze esterilizada, em um balão de fundo chato;

g) deitar na suspensão bacteriana, para cada 100 ml, 5 ml de solução aquosa a 1%, esterilizada a 120°C por 5 minutos, do corante vital 2-3-5 cloreto de trifênil-tetrazólio que, reduzido, cora os germes de vermelho. Pode-se usar, também, outro corante, o tetrazólio azul: 3:3' dianisol-bis 4:4 - (3:5 difenil) cloreto de tetrazólio; este, quando reduzido, cora os germes de azul. Tanto faz um como outro; os resultados são idênticos. Geralmente, dentro de 60 minutos, consegue-se o colorido mais intenso, já que, depois disso, a tonalidade permanece inalterável;

h) juntar à suspensão colorida, álcool puro absoluto, na proporção de 100% do volume da suspensão;

i) guardar o balão por 24 horas, em temperatura ambiente; executar prova de esterilidade, semeando tubo de ágar com uma gota de suspensão;

j) proceder à lavagem da suspensão, centrifugando-a fortemente, 4.000 a 5.000 rotações por minuto, durante 30 minutos; desprezar a salina alcoolizada. Repetir a centrifugação tantas vezes quantas necessárias, até que o líquido sobrenadante saia incolor;

k) colher com espátula o sedimento, pesar em balança de precisão, sensível ao centígrama; deitar o purê bacteriano pesado em gral de vidro ou porcelana e, a seguir, juntar-lhe, pouco a pouco, misturando energeticamente, sacarose pró-análise finamente pulverizada, até que a massa da sacarose adicionada iguale o dobro do peso do purê bacteriano;

l) deixar o gral, coberto, por uma noite, em banho-maria a 52°C; no dia seguinte, colher o líquido sobrenadante, por inversão do gral, desprezando o sedimento, quase sólido, formado por excesso de sacarose que não se incorporou aos germes. Ao sobrenadante, juntar duas gotas de solução de mertiolato a 1% correspondentes a cada grama do purê bacteriano que se obteve;

m) fazer a impregnação das folhas do papel da seguinte forma: tomar uma agulha nº 20 (calibre americano) seccionada transversalmente, na distância de um centímetro da inserção no canhão, e encher esse canhão com algumas gotas do antígeno; em geral, 3 bastam. A seguir, com a ponta da agulha encostada à superfície do papel, procurar, com movimentos circulares, impregná-lo de maneira a formar uma mancha que meça 2 milímetros de diâmetro. Distanciar a mancha da borda do papel, aproximadamente 5 milímetros. Deixar secar o papel, impregnado com as gotas do antígeno, em temperatura ambiente, por uma hora; depois, guardar em envelopes, também em temperatura ambiente. A duração do antígeno é de 60 dias, aproximadamente. Para que esse tempo de validade fosse maior — 12 meses, e até mais — tornar-se-ia necessário que, logo após a secagem em temperatura ambiente, fossem os papéis ensacados em sacos

* Oxoid

de plástico impermeável, e fechados hermeticamente, para impedir contato com a umidade ambiente.

3.2.2 Antígenos para reação de Widal

Preparam-se os antígenos de *Salmonella typhi* "somático e flagelar" da seguinte maneira:

3.2.2.1 Antígeno somático

a) Empregou-se a técnica de BIEN³, ligeiramente modificada: em garrafas de Roux, com ágar nutritivo ligeiramente alcalino, de pH 7,4, de preferência Tryptone-Soy-Agar (*) das quais se colheu previamente a água de condensação, semeou-se a raça O 901, comprovadamente lisa, mediante as seguintes verificações; produção de colônias perfeitamente lisas em placas do mesmo meio nutritivo, inaglutinabilidade em solução salina fisiológica e em solução aquosa de Tripaflavina a 0,5%.

b) A sementeira é feita deste modo: cultiva-se por 18 horas a raça O 901 em tubos de 16 a 160 mm com ágar nutritivo; colhe-se o crescimento com solução salina isotônica a 0,85%, 5 ml para cada tubo, o que fornece a emulsão necessária para semear uma garrafa de Roux.

c) Incubam-se as garrafas a 37°C, com a superfície de ágar voltada para cima, durante 24 horas.

d) Colhe-se o líquido que serviu para semear e lavam-se as garrafas com 10 ml de salina; a emulsão resultante é então deitada em balão de fundo chato. De todas as garrafas faz-se um esfregaço e cora-se pelo Gram, para descartar possíveis garrafas contaminadas, antes de se proceder à mistura final no balão.

e) Deita-se no balão álcool etílico puro, absoluto, na proporção de 200% do volume da suspensão bacteriana e deixa-se em contato 24 horas.

f) Centrifuga-se a suspensão, durante meia hora a 3.000 rotações por minuto; descarta-se o álcool, emulsiona-se com salina isotônica e repete-se a operação três vezes; deita-se fora o líquido sobrenadante final e emulsiona-se o centrifugado em salina com 20% de álcool.

g) Por tentativas, usando-se a salina alcoolizada a 20% como diluente, procura-se conseguir que a suspensão bacteriana fique com concentração tal que, diluída a 1%, tenha opacidade igual ao tubo n° 1 da escala de Mac Farland. Essa é a concentração final, pronta para ser envasada, e que foi por nós empregada nas reações de Widal. Guarda-se o antígeno pronto na geladeira.

3.2.2.2 Antígeno flagelar

a) Empregou-se a técnica preconizada por GILBERT, COLEMAN & LAVIANO¹²; usa-se a raça H 901, perfeitamente lisa e móvel, comprovando-se essa condição mediante semeadura em ágar nutritivo e verificando-se o aspecto das colônias e a inaglutinabilidade pela Tripaflavina, como se descreveu para a raça O 901.

b) Em cada garrafa de Roux, da qual não se retirou a água de condensação, semeia-se o crescimento de 24 horas, em tubos de 16 x 160 mm de ágar nutritivo, ou Tryptone-Soy-Agar(*) e que se colheu com 10 ml de salina isotônica.

c) Incubam-se as garrafas de Roux, com a camada de ágar voltada para baixo, durante 24 horas a 37°C.

(*) Oxoid

d) Colhe-se o crescimento mediante lavagem das garrafas com 10 ml de salina isotônica, formolada a 0,2%, por garrafa, com o auxílio de cilindros de vidro, de aproximadamente 3 cm, que são deslocados sobre a superfície do ágar por movimentação em báscula da garrafa; junta-se tudo em balão de fundo chato.

e) Antes de se fazer a mistura final, é necessário examinar, pelo método de Gram, o crescimento de cada garrafa, para afastar possíveis contaminações.

f) O antígeno, concentrado, conserva-se em geladeira mais ou menos a 5°C e dilui-se a 1% no momento de usar. A concentração desse antígeno é igual, aproximadamente, ao tubo nº 1 da escala de Mac Farland; consegue-se a concentração ideal do antígeno procedendo-se por tentativa, usando-se salina formolada a 0,2%.

3.3 Reação de Fixação em Superfície

3.3.1 Técnica

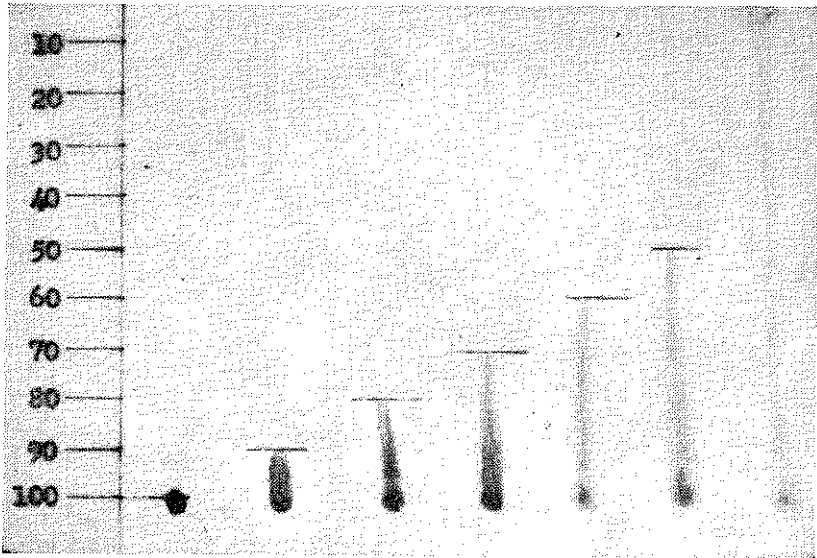
Executa-se a reação de fixação em superfície (que por brevidade, no decorrer deste trabalho, será denominada F.S.) da seguinte maneira: com alça de níquel-cromo, de 3 milímetros de diâmetro, deita-se, sobre a mancha do antígeno, uma gota do soro a examinar. Toma-se o cuidado de sempre usar, como testemunha, um soro seguramente negativo. A seguir, prende-se o papel pela parte superior num suporte e mergulha-se a borda inferior do papel em solução salina isotônica e aguarda-se que a força da capilaridade faça subir a salina até o extremo superior do papel; nesse momento, cerca de 10 minutos, a reação está terminada e os resultados podem ser lidos.

3.3.2 Interpretação

Interpretam-se os resultados da seguinte maneira: em primeiro lugar, verifica-se se a mancha do antígeno onde se depositou o soro negativo foi arrastada totalmente pela salina deixando, apenas, em seu trajeto ascensional, um rastro levemente colorido, concentrando-se na borda superior. Em seguida, comparativamente à marca que deixa o soro negativo na sua subida, qual o grau de fixação havido; será de 100%, se a mancha colorida não se moveu do lugar; de 50%, se a coluna colorida resultante do deslocamento do antígeno atingir à metade da extensão do papel. Os valores intermediários, 60% — 70% — 80% e 90%, medem-se mediante a aplicação de uma régua feita do mesmo papel de filtro, onde se desenharam, espaçadamente, riscos de tinta indelével, que representam as diferentes alturas que a coluna do antígeno pode atingir em sua marcha ascendente. A figura 1 esclarece perfeitamente o que acabamos de dizer, pois nela encontramos todos os diferentes valores de fixação que se descreveram.

Não são todos os papéis de filtro que se prestam à prática da F. S. ; o papel inicialmente empregado, com ótimos resultados, de fabricação Eaton-Dickeman Nº 609 teve de ser substituído, em vista das irregularidades que posteriormente passou a apresentar, substituição nada fácil de realizar, aliás, pois que se tornou necessário experimentar, aproximadamente, 50 tipos diferentes, até recair a escolha sobre o papel "Ederol" nº 20(*). Em nossas pesquisas, adotamos como valor mínimo diagnóstico a fixação de 50%; consideramos como negativa toda fixação de percentagem inferior a esse valor, tendo em vista que todos os soros de casos com hemocultura positiva testados acusaram valores iguais ou acima de tal porcentagem. Aliás, essa é a opinião de RUIZ CASTAÑEDA²⁵, particularmente no que se refere a pessoas de menos de 15 anos.

(*) Fabricado por J.C. Binzer, Hatzfeld/Eder, Alemanha Ocidental.



Reprodução de reação com fixação de 100% até reação negativa.

3.4 Reação de Widal

3.4.1 Técnica

As reações de Widal, tanto somáticas quanto flagelares, executavam-se de acordo com a técnica em uso há vários anos na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz¹⁷ e que é a seguinte: Usa-se série de 5 tubos, de 12 x 120 mm, para cada antígeno (somático e flagelar).

Do segundo ao quinto tubos, distribuem-se 0,5 ml de solução fisiológica em cada. Adicionam-se 0,5 ml de soro, diluído a 1/25, ao primeiro e segundo tubos. Misturam-se o soro diluído e a solução fisiológica do segundo tubo, transferem-se 0,5 ml da mistura para o terceiro tubo, repetindo-se essa operação até o quinto tubo, do qual, após misturar, retiram-se 0,5 ml desprezando-os. O soro, assim diluído, ficará com os seguintes títulos: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400. Juntam-se 0,5 ml da emulsão de antígeno a cada tubo, ficando, pois, dobradas as respectivas diluições. Essa junção é feita: a) para reações somáticas imediatamente após a diluição, agitando-se os tubos e levando-os à estufa a 37°C, onde permanecem até o dia seguinte (18 a 24 horas); b) para as reações flagelares, os tubos com as diluições de soro são colocados em geladeira até o dia seguinte, quando será feita a junção

de 0,5 ml de antígeno flagelar, indo os tubos para banho-maria a 52°C, onde permanecem por 2 horas. Ao fim desse tempo, faz-se a leitura de todos os tubos, tanto dos que ficaram na estufa como dos retirados do banho-maria. Usa-se testemunho de cada antígeno (0,5 ml da solução fisiológica e 0,5 ml de antígeno diluído). A leitura deve ser feita de preferência com lupa, anotando-se a última diluição na qual são visíveis grumos.

3.4.2 Interpretação

Os títulos considerados positivos, segundo essa técnica, e por nós adotados, são os seguintes: antígeno somático igual a 1:100 ou maior; antígeno flagelar igual a 1:200 ou maior.

3.5 Hemoculturas

As hemoculturas foram realizadas de acordo com técnica vigorante na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz¹⁶ e que é a seguinte:

Além da colheita em caldo glicosado citratado, as *S. typhi* e *paratyphi* podem ser satisfatoriamente isoladas do próprio coágulo de sangue. Uma vez retirado o soro, colocar, com pipeta estéril, no mesmo recipiente onde ficou o coágulo, cerca de 10 ml de bile-nutrose. Incubar a 37°C por 24 horas. Após 24 horas,

com pipeta ou alça de platina, retirar algumas gotas do meio e semeá-las em placas de ágar-ácido rosólico ou do meio de Holt-Harris-Teague, espalhando-as com bastão de vidro. Não havendo crescimento microbiano nas placas, repetir as mesmas operações após 48 horas e após 5 dias, partindo sempre da cultura original, que permanecerá na estufa. Três subculturas negativas são suficientes para dar resultado negativo.

Havendo colônias suspeitas, passá-las para tríplice-açúcar e depois identificá-las. Se o comportamento em tríplice-açúcar for idêntico ao de *S. typhi*, submeter imediatamente essa cultura às provas de aglutinação com soros típicos somático IX e flagelar "d".

A prova de aglutinação será feita em lâmina, emulsionando-se, com alça de platina, o crescimento da parte inclinada do tríplice açúcar diretamente com as gotas de soro previamente colocadas na lâmina, tendo-se cuidado de fazer testemunho da emulsão em solução salina, para controlar possíveis auto-aglutinações.

3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos, constantes de quadros adiante apresentados, foram analisados em função dos diagnósticos laboratoriais feitos pelo método em estudo comparativamente com a reação de Widal.

Em estudos nos quais se pretende escolher, entre dois métodos experimentais, aquele capaz de acusar a maior positividade, o mesmo indivíduo ou material é usado como seu próprio controle. Assim sendo, em tais experimentos, o problema de colocar em prova a hipótese de nulidade (H_0), de que os dois métodos apresentam proporções iguais de positividade, contra a hipótese alternativa (H_1), de que diferem tais proporções, envolve comparações de amostras não independentes. Em tais casos é indicado o emprego do teste das mudanças de MC NEMAR²⁰, que evita a consideração da correlação entre as duas amostras.

O teste de Mc Nemar consiste no cálculo de: $X^2 = \frac{(b-c)^2}{(b+c)}$, que se distribue aproximadamente segundo a distribuição X^2 com um grau de liberdade.

Considerando-se a natureza dos dados no presente trabalho e os objetivos a que ele se

propôs, fez-se necessária a adoção do referido teste que, no intuito de ter reforçada sua eficiência, foi empregado com a correção de continuidade de Yates (X^2_c)

4. RESULTADOS

4.1 Resultados obtidos pelo emprego da reação de fixação em 100 soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura positiva para *Salmonella typhi*

As reações de fixação em superfície realizadas nesses casos sempre foram positivas, mostrando as seguintes porcentagens de fixação:

50%	2 casos
60%	7 casos
70%	27 casos
80%	31 casos
90%	23 casos
100%	10 casos

Verifica-se, à simples inspeção, que a grande maioria dos casos (91) situou-se na faixa de maior positividade (70 a 100%).

4.2 Apreciação dos valores médios da reação de fixação em superfície em 98 casos com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura positiva para *Salmonella typhi* em relação às idades dos pacientes

Verifica-se que, contrariamente ao que foi assinalado por RUIZ CASTAÑEDA²⁷ e GUTIERREZ *et alii*¹⁵, no México, onde é possível encontrar em crianças de menos de 15 anos valores diagnósticos de fixação tão baixos como 50% e mesmo 25%, entre nós esses níveis situam-se sempre acima de 70%, não havendo diferenças com os dos demais grupos etários.

QUADRO I

Distribuição, por idades, dos valores médios da reação em 98 casos de febre tifóide, com hemocultura positiva

Idade (anos)	N.º Casos	Valores médios da porcentagem de fixação (%)
0 - 5	9	78,8
6 - 10	12	80,0
11 - 15	14	77,6
16 - 20	19	80,0
> - 20	44	79,8

4.3 *Comparação entre os resultados das reações de fixação em superfície e de Widal (somática e flagelar), executadas simultaneamente em 100 soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura positiva para Salmonella typhi.*

Submetidos os dados constantes dos qua-

dro II e III à análise estatística (quadros IV e V), verificou-se, de acordo com os valores X^2 encontrados, que diferem significativamente as proporções de positividade encontradas nas reações de fixação em superfície e de Widal, o que permite concluir pela maior sensibilidade da primeira.

QUADRO II

Resultados das reações de fixação em superfície e de Widal "O" (somática) realizadas simultaneamente em 100 soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura positiva para Salmonella typhi

Reação de fixação em superfície	Reação de Widal "O"					Total
	Positiva (título)				Negativa	
	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800		
Positiva a						
50%	1	—	—	—	1	2
60%	1	2	2	—	2	7
70%	3	4	7	8	5	27
80%	3	3	10	9	6	31
90%	—	1	2	16	4	23
100%	—	2	—	8	—	10
Negativa	—	—	—	—	—	—
Total	8	12	21	41	18	100

QUADRO III

Resultados das reações de fixação em superfície e de Widal "H" (flagelar) realizadas simultaneamente em 100 soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura positiva para Salmonella typhi

Reação de fixação em superfície	Reação de Widal "H"			Negativa	Total
	Positiva (título)				
	1 : 200	1 : 400	1 : 800		
Positiva a					
50%	1	—	1	—	2
60%	—	1	3	3	7
70%	1	5	13	8	27
80%	5	5	15	6	31
90%	—	1	17	5	23
100%	1	1	7	1	10
Negativa	—	—	—	—	—
Total	8	13	56	23	100

QUADRO IV

Comparação dos resultados das reações de fixação em superfície (F.S.) com os das reações de Widal "O" (W."O")

F.S. \ W."O"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	82	–	82
Neg.	18	–	18
Total	100	–	100

$\chi^2_c = 16,05$
 $P < 0,001$

4.4 *Comparação entre os resultados das reações de fixação em superfície e de Widal (somática e flagelar), executadas simultaneamente em:*

- a) 50 soros positivos nas reações de Wassermann e de V.D.R.L. (quadros VI e VII);
- b) 50 soros com reação de aglutinação positiva para leptospiras (quadros VIII e IX);
- c) 50 soros de reação positiva de imunofluorescência e/ou de Sabin-Feldman para toxoplasmose (quadros X e XI) e

QUADRO VI

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W."O" realizadas simultaneamente em 50 soros positivos nas reações de Wassermann e V.D.R.L

F.S. \ W."O"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	15	15
Neg.	0	35	35
Total	0	50	50

$\chi^2_c = 13,06$
 $P < 0,001$

QUADRO V

Comparação dos resultados das reações de fixação em superfície com os das reações de Widal "H" (W."H")

F.S. \ W."H"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	77	–	77
Neg.	23	–	23
Total	100	–	100

$\chi^2_c = 21,04$
 $P < 0,001$

- d) 50 soros positivos nas reações de aglutinação, "spot-test" e fixação em superfície para brucelose (quadros XII e XIII).

Verificou-se, usando simultaneamente as reações de fixação em superfície e de Widal (somática e flagelar) em casos de outras moléstias que não febre tifóide, a existência de diferenças significativas em todas as comparações entre a F.S. e Widal "O", não tendo sido encontrada essa diferença apenas entre F.S. e Widal "H" realizadas em soros de casos de sífilis e toxoplasmose.

Pode-se, assim, concluir serem as duas reações diferentes no que tange à positividade, e que há maior especificidade por parte da reação de fixação em superfície

QUADRO VII

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W."H" realizadas simultaneamente em 50 soros positivos nas reações de Wassermann e V.D.R.L

F.S. \ W."H"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	2	2
Neg.	0	48	48
Total	0	50	50

$\chi^2_c = 0,5$
 Não significativo

QUADRO VIII

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W. "O" realizadas simultaneamente em 50 soros positivos nas reações de aglutinação para Leptospiras

F.S. W. "O"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	35	35
Neg.	0	15	15
Total	0	50	50

$$X_c^2 = 33,02$$

$$P < 0,001$$

QUADRO X

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W. "O" realizadas simultaneamente em 50 soros com reações positivas para Toxoplasmose

F.S. W. "O"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	21	21
Neg.	0	29	29
Total	0	50	50

$$X_c^2 = 19,04$$

$$P < 0,001$$

QUADRO XII

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W. "O" realizadas simultaneamente em 50 soros com reações positivas para Brucelose

F.S. W. "O"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	32	32
Neg.	0	18	18
Total	0	50	50

$$X_c^2 = 33,3$$

$$P < 0,001$$

QUADRO IX

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W. "H" realizadas simultaneamente em 50 soros positivos nas reações de aglutinação para Leptospiras

F.S. W. "O"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	9	9
Neg.	0	41	41
Total	0	50	50

$$X_c^2 = 7,11$$

$$P < 0,01$$

QUADRO XI

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W. "H" realizadas simultaneamente em 50 soros com reações positivas para Toxoplasmose

F.S. W. "H"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	3	3
Neg.	0	47	47
Total	0	50	50

$$X_c^2 = 1,3$$

$$\text{Não significativo}$$

QUADRO XIII

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W. "H" realizadas simultaneamente em 50 soros com reações positivas para Brucelose

F.S. W. "H"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	15	15
Neg.	0	35	35
Total	0	50	50

$$X_c^2 = 13,06$$

$$P < 0,001$$

4.5 *Comportamento da reação de fixação em superfície, em 160 soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura negativa, comparativamente com a reação de Widal*

Essa série de resultados, que constam dos quadros XIV e XV, apesar de proveniente de indivíduos com diagnóstico clínico de febre tifóide, não comporta entretanto apreciação definitiva, pelo fato de serem negativas as respectivas hemoculturas.

Pareceu-nos, porém, interessante cotejar esses resultados com os da reação de Widal que, em casos dessa natureza, é a base do diagnóstico.

As duas reações comportaram-se, aproximadamente, da mesma maneira, acusando porcentagens de positividade de 88,1% para fixação em superfície, 89,3% para reação de Widal somática e 71,2% para a reação de Widal flagelar.

QUADRO XIV

Resultados das reações de F.S. e W. "O" realizadas simultaneamente em 160 soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura negativa para Salmonella typhi

Reação de Fixação em superfície	Reação de Widal "O"					Total
	Positiva (título)				Negativa	
	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800		
Positiva a						
50%	—	—	1	1	—	2
60%	2	6	5	—	2	15
70%	4	12	7	14	2	39
80%	3	5	10	24	5	47
90%	—	1	4	13	1	19
100%	—	—	3	15	1	19
Negativa	5	6	2	—	6	19
Total	14	30	32	67	17	160

QUADRO XV

Resultados das reações de F.S. e W. "H" realizadas simultaneamente em 160 soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura negativa para Salmonella typhi

Reação de Fixação em superfície	Reação de Widal "H"				Total
	Positiva (título)			Negativa	
	1 : 200	1 : 400	1 : 800		
Positiva a					
50%	—	—	1	1	2
60%	3	2	4	6	15
70%	6	9	14	10	39
80%	4	5	23	15	47
90%	3	—	15	1	19
100%	2	4	9	4	19
Negativa	1	—	9	9	19
Total	19	20	75	46	160

4.6 *Comportamento da reação de fixação em superfície, em 340 soros de pacientes com classificação final de “moléstias indeterminadas”*

Também nestes casos (quadros XVI e XVII) a amostragem não permitiu conclusões

definitivas. Comparativamente à reação de Widal, a F.S. apresentou, aproximadamente, a mesma porcentagem de positividade – 23,2% sendo que a reação de Widal somática revelou 21,5% e a flagelar, 18,2%.

QUADRO XVI

Resultados das reações de F.S. e de W.“O” realizadas simultaneamente em 340 soros de pacientes de moléstias indeterminadas e hemoculturas negativas

Reação de Fixação em superfície	Reação de Widal “O”					Total
	Positiva (título)				Negativa	
	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800		
Positiva a						
50%	—	—	—	—	—	—
60%	10	6	—	—	8	24
70%	3	1	—	6	13	23
80%	—	3	2	3	4	12
90%	1	2	—	7	1	11
100%	—	1	—	3	5	9
Negativa	19	4	2	—	236	261
Total	33	17	4	19	267	340

QUADRO XVII

Resultados das reações de F.S. e W.“H” realizadas simultaneamente em 340 soros de pacientes de moléstias indeterminadas e hemoculturas negativas

Reação de Fixação em superfície	Reação de Widal “H”				Total
	Positiva (título)			Negativa	
	1 : 200	1 : 400	1 : 800		
Positiva a					
50%	—	—	—	—	—
60%	3	1	4	16	24
70%	4	2	—	17	23
80%	2	2	4	4	12
90%	—	3	6	2	11
100%	—	1	3	5	9
Negativa	12	8	7	234	261
Total	21	17	24	278	340

5. CONCLUSÕES

À vista do que foi explanado, é lícito deduzir que:

1. A sensibilidade da reação de fixação em superfície é bem mais acentuada do que a da reação de Widal.

2. A reação de fixação em superfície é mais específica do que a de Widal no diagnóstico sorológico da febre tifóide.

3. A fixação em superfície é de realização mais rápida e de leitura mais fácil do que a reação de Widal.

4. Para maior segurança do diagnóstico sorológico da febre tifóide, o emprego da reação de fixação em superfície é aconselhável na rotina dos laboratórios que se encarregam de trabalhos dessa natureza.

6. RESUMO

BRANDÃO, C.S.H. — Reação de fixação em superfície como método diagnóstico laboratorial da febre tifóide. Estudo comparativo com a reação de Widal. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 17-35, 1972.

Soros de 100 pacientes com febre tifóide confirmada foram testados simultaneamente pela reação de fixação em superfície e pela reação de Widal com antígeno somático e com antígeno flagelar, em comparação com os resultados de hemocultura.

Houve concordância absoluta entre os resultados de hemocultura e de reação de fixação em superfície, enquanto que a reação de Widal foi negativa em 18 casos, com antígeno somático e, em 24 casos, com antígeno flagelar. Em 200 casos de pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de outras moléstias infecciosas, a reação de fixação em superfície sempre foi negativa, enquanto que a reação de Widal, com antígeno somático, foi positiva em 52% e, com antígeno flagelar, em 14,5% dos casos.

É sugerida a adoção da reação de fixação em superfície no diagnóstico laboratorial da

febre tifóide em razão de sua maior sensibilidade e maior especificidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, J.P. & LACERDA JR., P.M.G. — Estudos sobre a vacinação antitífica. 1. Vacinação pelo método de Felix. *Mems Inst. Butantan*, 20: 227-232, 1947.
2. BARACCHINI, O. — *Estudo comparativo das reações de aglutinação de Grüber-Widal e de precipitação no diagnóstico sorológico da febre tifóide*. Ribeirão Preto, 1951. p. 71. [Tese Profess. — Faculdade de Medicina da Universidade de Ribeirão Preto].
3. BIEN, Z. apud GILBERT, R.; COLEMAN, M.B. & LAVIANO, A.B.¹² p. 228.
4. CARRIJO, L.N.; PIRES, C. D'A. & BRANDÃO, C. — Vacinação T.A.B. Formação de aglutinina "O" no homem pelo emprego de vacina formolada. *Mems Inst. Butantan*, 18: 45-54, 1944/45.
5. CHARRIN, & ROGER, G.H. apud BOUCHARD, C. & ROGER, G.H. — *Nouveau traité de pathologie générale*. Paris, Masson, 1912. v. 1, p. 514.
6. DIEULAFOY, G. — *Manual de pathologie interne*. 15. ed. Paris, Masson, 1908. p. 181.
7. DREYER, G. — Widal's reaction with sterilised cultures. *J. Path. Bact.*, 13: 331-337, 1909.
8. FELIX, A. — The qualitative receptor analysis and its application to typhoid fever. *J. Immun.*, 9: 115-192, 1924.
9. FELIX, A. — The qualitative serum diagnosis of enteric fevers. *Lancet*, 1: 505-507, 1930.
10. FELIX, A. Standardisation des épreuves d'agglutination servant au diagnostic de fièvre typhoid et fievres paratyphoids. *Bull. Org. Mond. Santé*, 2: 685-691, 1950.
11. FELIX, A. apud TOPLEY, W.W. & WILSON, G.S. — *Bacteriologia e inmunidad*. Traducion de la tercera edicion inglesa, por José Estelles Salarich. Barcelona, Salvat, 1953. v.2, p. 1519.
12. GILBERT, R.; COLEMAN, M.B. & LAVIANO, A.B. — A story of the granular and floccular types of agglutination with *B. typhosus*. *J. Lab. Clin. Med.*, 19: 225-231, 1933.
13. GRUBER apud WIDAL, F. & SICARD, A.³³ p. 358.

14. GRUBER & DURHAN apud WIDAL, F. & SICARD, A.³³ p. 359.
15. GUTIERREZ, T.; BENAVIDES, L.; KUMATE, J. & RANGEL, L. – Encuesta inmunológica en la población infantil. 1. Investigación de anticuerpos contra *S. typhosa* por meio de la reacción de fijación en superficie. *Bol. Méd. Hosp. Infant.* (México), 19: 107, 1962.
16. INSTITUTO ADOLFO LUTZ – Hemoculturas. I.A.L.: *Bol. Inst. Adolfo Lutz*, 1(2): 7, 1961.
17. INSTITUTO ADOLFO LUTZ – Reações de Widal e de Weil-Felix. I.A.L.: *Bol. Inst. Adolfo Lutz*, 1(1): 36-37, 1961.
18. KRAUS, R. apud TULASNE, R. & KUHLMANN, A. MANN, A.³² p. 299.
19. LEME, J.S.M. & CARRIJO, L.N. – Nível médio de aglutininas tíficas em São Paulo. *Mems Inst. Butantan*, 17: 121-125, 1943.
20. McNEMAR, A. – Note on the sampling error of the difference between correlated proportions on percentage. *Psychometrika*, 12: 153-157, 1947.
21. RELATÓRIO. Instituto Bacteriológico de São Paulo: 1894-1895. São Paulo (1895) p. 37.
22. REYNOLDS, D.W.; CARPENTER, Le R.R. & SIMON, W.H. – Diagnostic specificity of Widal's reaction for typhoid fever. *J. Am. Med. Ass.*, 214(12): 2191-92, 1970.
23. RUIZ CASTAÑEDA, M. – *Libro conmemorativo del primer centenario – Academia Nacional de Medicina – 1864-1964*. México, 1964. v. 2, p. 200-207.
24. *Ibid.* p. 199.
25. *Ibid.* p. 204.
26. *Ibid.* p. 208
27. RUIZ CASTAÑEDA, M. – Reacciones sorológicas para el diagnóstico de las reacciones febriles. *Bol. Méd. Hosp. Infant.* (México), 18: 74-75, 1961.
28. RUIZ CASTAÑEDA, M. – Selective agglutination. A possible substitute for the absorptive test in the classification of *Brucella*, *Salmonella* or their antisera. *J. Immun.*, 43: 203-211, 1942.
29. RUIZ CASTAÑEDA, M. – Surface fixation. A new method of detecting certain immunological reactions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 73: 46-49, 1950.
30. SCHROEDER, S.A. – Interpretation of serologic tests for typhoid fever. *J. Am. Med. Ass.*, 206(4): 839-840, 1968.
31. TAUNAY, A.E. apud SCHMID, A.W. – *Contribuição para o conhecimento da epidemiologia da febre tifóide através da pesquisa de portadores*. São Paulo, 1966. [Tese profess. – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].
32. TULASNE, R. & KUHLMANN, A. – Étude des précipitines dans la fièvre typhoid 'a l'aide d'antigènes purifiés. *Ref. Immun.*, 5: 299-316, 1939.
33. WIDAL, F. & SICARD, A. – Étude sur le séro-diagnostic et sur la réaction agglutinante chez les typhiques. *Annls Inst. Pasteur (Paris)*, 11: 353-452, 1897.
34. *Ibid.* p. 359
35. *Ibid.* p. 369-370.
36. WIDAL, apud BOUCHARD, C. & ROGER, G.H. – *Nouveau traité de pathologie generale*. Paris, Masson, 1912. v. 1, p.523.
37. WIDAL, F. apud GASTINEL, P. – *Précis de bacteriologie médicale*. Paris, Masson, 1949. p. 392.
38. ZINSSER, H. & BAYNE-JONES, E. – *Tratado de bacteriologia*. Tradução brasileira da 8ª edição americana, por Aristides Monteiro. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1947. p. 213.

Recebido para publicação em 10 de maio de 1972.



EMPREGO DO ÁCIDO ROSÓLICO NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *BRUCELLA*

USE OF ROSOLIC ACID IN THE IDENTIFICATION OF SPECIES OF THE GENUS *BRUCELLA*

SEBASTIÃO DE CAMARGO CALAZANS (1)
CELSO SOARES HABERBECK BRANDÃO (2)

SUMMARY

CALAZANS, S.C. & BRANDÃO, C.S.H. — Use of rosolic acid in the identification of species of genus *Brucella*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 32: 37-40, 1972.

The utilization of the rosolic acid (dyphenyl-cresol-carbinol anhydride) in chromobacteriostasis tests is described as an additional element for the identification of the species *Brucella suis*.

INTRODUÇÃO

O processo de cromobacteriostase, desenvolvido em 1943 por HUDDLESON², por sua simplicidade, a par de excelentes resultados práticos, é largamente empregado na diferenciação das espécies *melitensis*, *abortus* e *suis* do gênero *Brucella*. Entretanto, não pode ser considerado como decisivo, pois realmente diferencia apenas as espécies-tipos e nem sempre os demais tipos se comportam uniformemente nas diferentes faixas de concentração inibitórias dos corantes utilizados.

Visando a melhoria da capacidade discriminativa do método em causa, foi estudado, no presente trabalho, o emprego do ácido rosólico (anidrido de difenol-cresol-carbinol), em complementação à técnica de Huddleson.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

1.1 Ácido rosólico (anidrido de difenol-cresol-carbinol)⁽³⁾

1 g dissolvida em 50 ml de álcool absoluto, completado o volume até 100 ml com água destilada.

1.2 Soluções de fucsina básica e tionina, preparadas conforme Huddleson, utilizando lotes de corantes de atividade conhecida, segundo recomendação da Comissão de Peritos da Organização Mundial de Saúde (4).

a) Solução de fucsina básica: solução a 0,1% em água destilada esterilizada; deve ser preparada cada 60 dias.

b) Solução de tionina: solução a 0,1% em água destilada esterilizada; deve ser preparada cada 60 dias.

1.3 Meios de cultura

1.3.1 Ágar-triptose

Bacto-Tryptose (5)	20 g
Cloreto de sódio	0,5 g
Água destilada	100 ml
Bacto-Agar(5)	1,8 g

(1) Do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do laboratório I de Taubaté, S.P., do Instituto Adolfo Lutz.

(3) E. Merck, p.a., n.º 627.

(4) Fucsina básica — certificado n.º NF 58; tionina — certificado n.º 16 (Comité Mixte FAO/OMS d'Experts de la Brucellose — Deuxieme rapport — OMS Ser. Rapp. Techn., 1953, p. 67)

(5) Difco

Aquecer, em vapor fluente, até perfeita dissolução; esfriar a 60°C; acertar o pH a 6,8 — 7,1. Distribuir em balões de 100 ml; esterilizar a 120°C por 15 minutos.

1.3.2 Ágar-infusão de fígado (Stafseth-Huddleson)¹.

a) Infuso de fígado: misturar, em uma panela, 500 g de fígado de boi passado na máquina e 500 cm³ de água de torneira; cobrir a panela e aquecer em vapor fluente durante 20 minutos; misturar novamente o conteúdo e aquecer em vapor fluente mais 1 hora e meia; coar através de uma peneira para reter as partículas mais grosseiras e filtrar através de algodão de vidro.

b) Para preparar 1 litro de caldo de fígado:

Infuso de fígado	500 cm ³
Água de torneira	500 cm ³
Peptona	10 g
Cloreto de sódio puro	5 g

Aquecer em vapor fluente uma hora, deixar resfriar a 60°C, ajustar o pH a 7,0 e aquecer novamente em vapor fluente durante 1/2 hora. Filtrar em algodão de vidro, distribuir e esterilizar a 110°C, 1/2 hora. O pH final deverá ser próximo de 6,6.

c) Dissolver 20 g de ágar em 1 litro de caldo de fígado preparado como indicado precedentemente, filtrar em algodão de vidro, distribuir e esterilizar a 110°C, 1/2 hora. Para o isolamento a partir de material muito contaminado, adicionar a cada litro de ágar-fígado, 5 cm³ de uma solução a 0,1% de violeta de genciana (conc. final 1/200 000), a fim de inibir germes de contaminação gram-positivos.

1.3.3 *Brucella*-Ágar (1): preparado de acordo com as indicações do fabricante.

1.3.4 Ágar-infusão de batata (2): preparado de acordo com as indicações do fabricante.

1.4 Estirpes utilizadas:

a) *B. abortus* 1119-3, utilizada pelo Departamento de Indústria Animal, E.U.A., na preparação de antígenos⁷;

b) *B. abortus* 456, proveniente do Centro de Moléstias Transmissíveis, Atlanta, E.U.A., utilizada por SCHUBERT & HERNDON⁸ na preparação de antígenos de Wright experimentais;

c) *B. abortus* 544 (Weibridge)

d) *B. suis* S-6, utilizada pelo Centro de Estudos da Brucelose, de Montpellier, França, para a preparação de antígenos⁶;

e) *B. suis* 1130 (Mineápolis);

f) *B. melitensis* 16 M (Beltsville).

As amostras *B. abortus* 544, *B. suis* 1130 e *B. melitensis* 16 M são recomendadas pelo Comité Misto de Peritos da Brucelose, da O.M.S., como estirpes-padrão especialmente adequadas às provas de padronização da cromobacteriostase.

Foram utilizadas amostras verificadas apresentarem-se em fase lisa, conforme os conceitos atualmente em vigor^{3,4,9}.

2. Método

Foram sempre empregados meios sólidos, de fabricação recente. Os corantes, nas concentrações indicadas, foram juntados aos meios fundidos e estes eram aquecidos em banho-maria a 50°C por 5 minutos para obtenção de uma distribuição homogênea. Os meios foram, em seguida, distribuídos em placas de 100 x 20 mm, que eram colocadas em estufa a 37°C até desaparecimento da água de condensação.

As diluições finais dos corantes foram:

a) Ácido rosólico: 1/10.000; 1/20.000; 1/30.000; 1/40.000; 1/50.000; 1/80.000 e 1/100.000;

b) Fucsina básica e tionina: 1/50.000 e 1/100.000.

Os inóculos das várias amostras de brucelas foram preparados cultivando-se 48 horas em tubos de *Brucella*-Ágar. Para semeadura das

(1) Albimi Laboratórios, n.º A 115.

(2) Difco, n.º B 51.

placas foi utilizado o induto bacteriano colhido com alça calibrada de 1 mm de diâmetro interno⁵ (duas alçadas suspensas em 1 ml de solução fisiológica). As sementeiras foram feitas em estrias, em placas divididas em setores, para efeito comparativo; foram utilizados ágar-fígado, *Brucella*-ágar, ágar-infusão de batatas e ágar-triptose. As placas foram incubadas a 37°C, durante 96 horas.

RESULTADOS

Inicialmente, foram examinados os quatro meios de cultura utilizados, para verificação das condições nutritivas mais adequadas ao

crescimento das amostras empregadas. O *Brucella*-Ágar e o ágar-fígado conduziram a resultados mais exatos e constantes no que se refere à intensidade e caracteres morfológicos do crescimento bacteriano; entretanto, também o ágar-infusão de batatas e o ágar-triptose permitiram resultados satisfatórios, embora menos nítidos. Assim sendo, foram escolhidos os dois primeiros meios para as observações subsequentes.

Para determinação da faixa de diluições determinantes de cromobacteriostase, foram realizadas dez determinações, cujos resultados estão expressos no quadro I:

QUADRO I

Ação bacteriostática do ácido rosólico sobre amostras de Brucella. Resultados de 10 observações em meio Brucella-ágar, com 48 h de incubação a 37°C

Espécies	Diluições						
	1:10.000	1:20.000	1:30.000	1:40.000	1:50.000	1:80.000	1:100.000
abortus	C	C	C	C	C	C	C
melitensis	C	C	C	C	C	C	C
suis	I	I	C	C	C	C	C

I – Inibição de crescimento
C – Crescimento

A influência do tempo de incubação foi verificada como mostra o quadro II:

QUADRO II

Ação bacteriostática do ácido rosólico a 1:20.000 sobre amostras de Brucella, em meio de ágar-fígado e incubação a 37°C, a 24, 48, 72 e 96 h de observação

Espécies	Tempo de incubação			
	24 h	48 h	72 h	96 h
abortus	+	++	++	++
melitensis	–	+	+	++
suis	–	–	–	–

+ Crescimento
– Ausência de crescimento

CONCLUSÕES

Pelos resultados apresentados pode-se verificar:

a) A ação bacteriostática do ácido rosólico em diluições até 1:20 000 e após 48 h de incubação é nítida com referência à *Brucella suis*, não apresentando o corante efeito inibidor, em qualquer concentração, sobre as espécies *abortus* e *melitensis*.

b) Os quatro meios testados – ágar-triptose, ágar-infusão de fígado, *Brucella*-ágar e ágar-infusão de batatas – embora, com pequenas variações, podem ser utilizados nas provas de cromobacteriostase.

c) A prova descrita poderá ser utilizada, juntamente com as provas clássicas – pela fucsina básica e tionina – como mais um elemento para caracterização de espécies do gênero *Brucella*.

RESUMO

CALAZANS, S.C. & BRANDÃO, C.S.H. – Emprego do ácido rosólico na identificação de espécies do gênero *Brucella*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 37-40, 1972.

O emprego do ácido rosólico (anidrido de difenol-cresol-carbinol) em provas de cromobacteriostase é descrito como mais um elemento para identificação da espécie *Brucella suis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIER, O.G. – *Bacteriologia e Imunologia, em suas aplicações à Medicina e à Higiene*. 11.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1963. p. 820.
2. HUDDLESON, I. F. et alii – *Brucellosis in man and animals*. Rev. ed. New York, Commonwealth, 1943 p. 49.
3. Ibid p. 13.
4. KAPLAN, M.M. – *Preparation du vaccin de Brucella abortus*. Ginebra, World Health Organization, 1965. p. 14 (WHO/Bruc/40).
5. MANTHEI, C.A. – *Methodes – type et autres d'isolement, d'identification et de classification des espèces de Brucella*. Ginebra, World Health Organization, 1965. p. 5. (WHO/Bruc/67).
6. RENOUX, G. – *Anticorps bloquants dans le serum de sujets brucelliques*. Ginebra, World Health Organization, 1965. p. 1 (WHO/Bruc/13).
7. SCHUBERT, J.M. & HERNDON, J.F. – Study of certain factors affecting the agglutination test for brucellosis. *Pb. Hlth Rep.* 65(2): 885–890, 1950.
8. Ibid. p. 888.
9. WHITE, P. G. & WILSON, J. B. – *Differentiation des colonies lisses et non lisses de Brucella*. Ginebra, World Health Organization, 1965. p. 1. (WHO/Bruc/35).

INCIDÊNCIA DE REAGENTES À PROVA DA IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA
PARA O DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE ENTRE ESCOLARES
DO MUNICÍPIO DE PRESIDENTE PRUDENTE (1)

THE INCIDENCE OF REAGENTS TO INDIRECT IMMUNOFLORESCENCE TEST FOR
DIAGNOSIS OF TOXOPLASMOSIS AMONG STUDENTS IN THE
REGION OF PRESIDENTE PRUDENTE, SÃO PAULO, BRAZIL

MARCELO OSWALDO ÁLVARES CORRÊA (2)
SABURO HYAKUTAKE (2)
JOSÉ FERREIRA TOGNOLI (3)

SUMMARY

CORRÊA, M.O.A.; HYAKUTAKE, S. & TOGNOLI, J.F. — The incidence of reagents to indirect immunofluorescence test for diagnosis of toxoplasmosis among students in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 41-46, 1972.

Three hundred and thirty eight sera from students of 9 to 15 years of age were tested by indirect immunofluorescence for toxoplasmosis.

One hundred and fifty one sera (44,7%) showed titers equal or higher than 1:256. These data when compared with those of another survey among indians of same age group of Upper Xingu River, Central Brazil (R. G. Baruzzi, 1968) showed similar results. The incidence of positive sera was higher in the urban area than in rural area.

The more frequent titer found was 1:8,000.

INTRODUÇÃO

Dentre as zoonoses de distribuição ubiqüitária avulta, pela sua importância em patologia humana, a toxoplasmose, como atesta o impressionante número de publicações científicas a ela referentes que têm enriquecido a bibliografia médica particularmente nos dois últimos decênios.

Entre nós, a toxoplasmose tem sido estudada sob múltiplos e diferentes aspectos desde a descoberta do agente causal por Splendore em 1908 até os nossos dias, conforme se pode avaliar pela recente revisão da bibliografia nacional efetuada por GOMES⁵ em 1970.

Em 1969 e 1970 tivemos oportunidade de proceder a inquérito sorológico entre escolares do ciclo primário matriculados em escolas pú-

blicas estaduais no município de Presidente Prudente, com o fito de averiguar a incidência de reagentes à prova da imunofluorescência indireta para evidenciação de anticorpos anti-toxoplasma. A apresentação destes dados constitui o objetivo da presente publicação.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa dentre escolares de 9 a 15 anos de idade, residentes nas zonas urbana e rural do município de Presidente Prudente, Estado de São Paulo, localizado a 22° 7'4,8" de latitude Sul e 51° 23'1,5" de longitude, com área de 555 km², altitude de 468 m e população de 105.455 habitantes.

Em sua absoluta maioria, os escolares exa-

- (1) Realizado na Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz. Apresentado ao 9º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, realizado em Fortaleza, Ceará, de 4 a 7 de fevereiro de 1973.
(2) Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.
(3) Do Laboratório I de Presidente Prudente, S.P., do Instituto Adolfo Lutz.

minados são naturais do município de Presidente Prudente, raros dos municípios vizinhos ou de outros estados.

Uma vez separados, os soros foram submetidos à prova da imunofluorescência indireta para o diagnóstico da toxoplasmose, de acordo com a técnica descrita por CAMARGO² ligeiramente modificada por Hyakutake que introduziu as seguintes modificações técnicas:

1. Com referência ao tempo de reação antígeno-anticorpo, é preferível incubar as lâminas da reação durante meia hora à temperatura de 37°C dentro da câmara úmida, em vez de uma hora a 37°C.

2. A observação da lâmina no microscópio de fluorescência é feita através de tubo monocular, pois o binocular acarretaria 40% de redução da luminosidade da imagem.

3. Na preparação do antígeno, em vez de usar a centrifugação diferenciada, isto é, o uso de baixa rotação para sedimentar os leucócitos (Goldman) antes de formolização do antígeno, rompem-se os leucócitos utilizando uma seringa munida de agulha BD n.º 3 ou n.º 4 (US n.º 27 ou 30), com a qual se pratica a expulsão e aspiração do exsudato, repetindo de 10 a 15 vezes a manobra.

4. Para a titulação do conjugado é escolhido um soro reagente padrão, ou melhor, um soro reagente de título estável conhecido, obtido através da reação de Sabin-Feldman, como por exemplo um soro de título 1:1 024. Com este soro fazem-se as diluições sucessivas a partir de 1:16, obtendo-se assim as diluições de 1:256, 1:512, 1:1 024 e 1:2 048 distribuídas em lâmina quadriculada e incuba-se meia hora a 37°C. Em seguida, preparam-se as diluições sucessivas do conjugado a testar, isto é, as diluições de 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 e 1:1 024 e distribuem-se sobre as três lâminas das diluições mencionadas do soro padrão. Feita a leitura, elege-se como título

do conjugado aquela diluição que apresenta fluorescência de média intensidade (++).

De acordo com a experiência de Hyakutake, os resultados obtidos com a prova da imunofluorescência indireta são superponíveis, até cerca de 98%, àqueles da prova de Sabin-Feldman.

COUTINHO *et alii*³ chegaram a conclusões análogas ao proceder à análise comparativa entre as sensibilidades das referidas provas diagnósticas.

RESULTADOS E COMENTÁRIOS

Foram examinadas 338 amostras de sangue de 123 escolares residentes na zona urbana e de 215 residentes na zona rural. Para efeito de comparação, com levantamentos sorológicos semelhantes foram considerados negativos os soros com títulos menores do que 1:256, e positivos, aqueles com valores iguais ou maiores do que 1:256. Assim sendo, encontraram-se 187 soros negativos e 151 reagentes à pesquisa de anticorpos antitoxoplasma, correspondendo às percentagens, respectivamente, de 55,3 de negatividade e 44,7 de positividade.

No quadro I estão configuradas a discriminação entre os resultados obtidos nas zonas rural e urbana, a distribuição por sexo, a distribuição dos reagentes entre os diferentes títulos e a distribuição por anos de idade.

Considerando-se apenas os grupos etários verifica-se:

1º grupo de 9 a 10 anos de idade: total de 174 examinados, sendo 71 reagentes (41%) e 103 negativos (59%).

2º grupo de 11 a 15 anos: total de 164 examinados, sendo 80 reagentes (49%) e 84 negativos (51%).

Estes resultados foram projetados em gráfico para comparação com os obtidos, em grupos etários análogos, por BARUZZI¹, entre índios do Alto Xingu e, em São Paulo, por JAMRA⁶

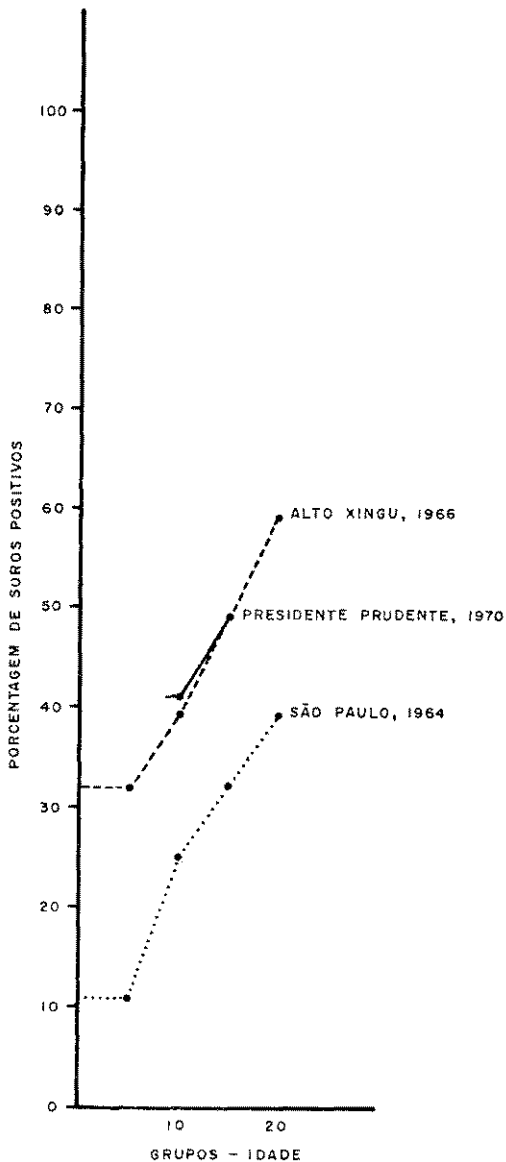
QUADRO I

Distribuição dos títulos dos soros reagentes segundo "habitat" e idade

"Habitat" Idade (anos)	N.º de soros testados	N.º de soros negativos	Número de soros positivos. Título 1:								Porcentagem de soros positivos (%)	
			256	1 024	2 048	4 000	8 000	16 000	32 000	Total		
Zona urbana												
9	33	18	6	1	0	3	5	0	0	15	45,4	
10	38	17	4	1	0	0	12	3	1	21	55,2	
11	32	10	7	0	0	3	6	3	3	22	68,7	
12	9	2	2	0	0	1	4	0	0	7	77,7	
13	6	1	1	0	0	0	3	0	1	5	50,0	
14	3	0	1	0	0	0	1	1	0	3	100,0	
15	2	0	0	0	0	0	1	1	0	2	100,0	
Total	123	48	21	2	0	7	32	8	5	75	60,9	
Masc.	66	24	11	1	0	4	19	5	2	42	63,6	
Fem.	57	24	10	1	0	3	13	3	3	33	57,8	
Zona rural												
9	54	36	0	1	3	3	8	0	3	18	33,3	
10	49	32	5	1	1	4	4	2	0	17	34,6	
11	37	21	2	2	3	3	6	0	0	16	43,2	
12	37	27	1	3	0	1	3	1	1	10	27,0	
13	23	15	2	0	0	3	2	1	0	8	34,7	
14	11	6	0	1	1	0	1	1	1	5	45,4	
15	4	2	0	1	0	1	0	0	0	2	50,0	
Total	215	139	10	9	8	15	24	5	5	76	35,3	
Masc.	121	71	9	5	4	10	14	4	4	50	41,3	
Fem.	94	68	1	4	4	5	10	1	1	26	27,7	

CORREIA, M.O.A.; HYAKUTAKE, S. & TOGNOLI, J.F. - Incidência de reagentes à prova da imunofluorescência indireta para o diagnóstico da toxoplasmose entre escolares do município de Presidente Prudente. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 41-46, 1972.

Gráfico 1



Ao exame do gráfico I, verifica-se que as linhas representativas da incidência de reagentes entre os escolares do município de Presidente Prudente e os índios, de igual idade, residentes no Alto Xingu, se superpõem praticamente, confirmando-se assim um dos comentários de Baruzzi.

“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”.

BARUZZI¹ assinala que 1:256 foi o título mais freqüente no inquérito que realizou no Alto Xingu, o mesmo ocorrendo no Amapá (DEANE *et alii*⁴) e em São Paulo (JAMRA⁶), representando esse título, respectivamente, 29,8%, 34,4% e 34,8% do total de reações positivas.

No inquérito atual, conforme demonstra o quadro II, o título mais freqüente foi o de 1:8 000 (37%) tanto entre escolares da zona urbana (42,6%) como entre os da zona rural (31,5%).

QUADRO II

Distribuição dos títulos entre os soros reagentes

Títulos da reação (1)	Soros reagentes	
	Número	Porcentagem (%)
256	31	20,6
1.024	11	7,3
2.048	8	5,3
4.000	22	14,5
8.000	56	37,0
16.000	13	8,6
32.000	10	6,7
Total	151	100,0

O quadro III evidencia a incidência de reagentes nas zonas urbana e rural.

A análise estatística dos dados constantes do quadro III mostra ser significativamente

QUADRO III

Incidência de reagentes nas zonas urbana e rural

"HABITAT"	Soros examinados		Total
	Reagentes	Não reagentes	
Zona Urbana	75	48	123
Zona Rural	76	139	215
Total	151	187	338

$X^2 = 20,67$

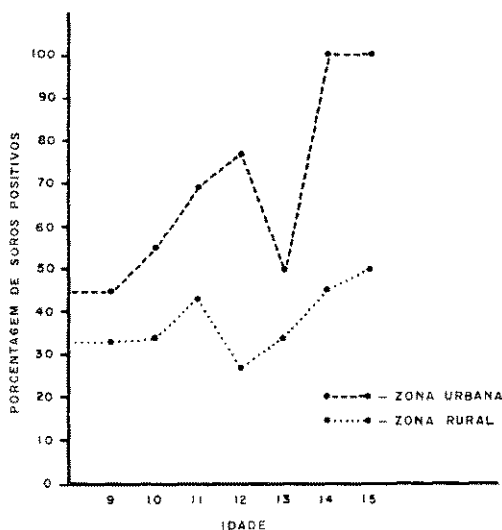
GL = 1

P < 0,001

maior a incidência de reagentes na zona urbana comparada com a zona rural permitindo a sugestão de que, ao menos neste agrupamento humano estudado, houve influência da maior densidade populacional da zona urbana na incidência de reagentes anti-toxoplasma.

O gráfico 2 evidencia este mesmo fato através da comprovação percentual dos reagentes nas zonas urbana e rural.

Gráfico 2



CONCLUSÕES

1. As incidências de reagentes entre os escolares do município de Presidente Prudente e os índios de idade análoga do Alto Xingu, praticamente se superpõem.

2. O título mais freqüente no atual inquérito foi o de 1:8.000, correspondendo à percentagem de 37%.

3. A incidência de reagentes foi significativamente maior entre escolares da zona urbana em comparação aos escolares da zona rural.

RESUMO

CORRÊA, M. O. A.; HYAKUTAKE, S. & TOGNOLI, J. F. — Incidência de reagentes à prova da imunofluorescência indireta para o diagnóstico da toxoplasmose entre escolares do município de Presidente Prudente. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 41-46, 1972.

Os autores examinaram amostras de sangue de 338 escolares do município de Presidente Prudente, de 9 a 15 anos de idade, pelo método da imunofluorescência indireta para o diagnóstico da toxoplasmose, encontrando 151 soros reagentes à pesquisa de anticorpos anti-toxoplasma (44,7%) ao título igual ou maior do que 1:256.

Concluíram que:

1. As incidências de reagentes entre escolares do município de Presidente Prudente e os índios de idade análoga do Alto Xingu praticamente se superpõem (R.G.Baruzzi, 1968).

2. O título mais freqüente foi o de 1:8.000 (37%).

3. A incidência de reagentes foi significativamente maior entre escolares da zona urbana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARUZZI, R.G. — Contribuição para o estudo epidemiológico da toxoplasmose. Levantamento sorológico em índios do Alto Xingu, Brasil Central. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30: 105-139, 1969/70,
2. CAMARGO, M.E. — Estudo comparativo das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência direta para a toxoplasmose, em 1 000 soros humanos. Comportamento anômalo de alguns soros. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 24: 1-26, 1964.

CORRÊA, M.O.A.; HYAKUTAKE, S. & TOGNOLI, J.F. — Incidência de reagentes à prova da imunofluorescência indireta para o diagnóstico da toxoplasmose entre escolares do município de Presidente Prudente. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 32: 41-46, 1972.

3. COUTINHO, S.G.; ANDRADE, C.M.; MALVAR, G.S. & FERREIRA, L.F. — Análise comparativa entre as sensibilidades da reação indireta de anticorpos fluorescentes e da reação de Sabin-Feldman na pesquisa de anticorpos séricos para toxoplasmose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* (Rio de Janeiro), 4(5): 314-325, 1970.
4. DEANE, L.M. *et alii* — Inquérito de toxoplasmose e de tripanossomíases realizado no território do Amapá pela III Bandeira Científica do Centro Acadêmico "Oswaldo Cruz" da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. *Rev. Med.* (São Paulo), 47 (1): 7-12, 1963.
5. GOMES, M.C.O. — Estado atual da toxoplasmose no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* (Rio de Janeiro), 4(2): 121-128, 1970.
6. JAMRA, L.M.F. — *Contribuição para a epidemiologia da toxoplasmose. Inquérito em 100 famílias de uma área da cidade de São Paulo.* São Paulo 1964. [Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Recebido para publicação em 25 de maio de 1972.

RESISTÊNCIA INFECCIOSA A DROGAS EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE ANIMAIS (1)

INFECTIOUS DRUG RESISTANCE IN *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ISOLATED FROM ANIMALS

GILBERTI MORENO (2)

SUMMARY

MORENO, G. — Infectious drug resistance in *Escherichia coli* strains isolated from animals. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 47-55, 1972.

Drug resistance of 375 strains of *Escherichia coli* originated from animals source to tetracycline, kanamycin, cephalotin, hetacylin and to streptomycin were determined.

The verification of infectious drug resistance expressed by the organisms used as donors were done by means of conjugation with the recipient strains of *Escherichia coli* K 12 (K12, 712R, and K12, J5F⁻).

The analysis of the results showed that almost all *Escherichia coli* strains examined appeared to be simultaneously resistant to two or three of these related drugs, arising clearly with higher incidence the last one's.

However, the most founded R factor in *Escherichia coli* strains originated from animal sources, were mainly integrated by resistance markers for sulphadiazine, chloramphenicol, and for tetracycline.

Moreover, none of multiple drug resistant strains with its R — factors carrying resistance markers for hetacylin, cephalotin and kanamycin, and those that appeared to be single drug resistant with resistance marker only for sulphadiazine, chloramphenicol or tetracycline, were all enable to act as transmissible strains for this purpose.

In addition, those cultures who had been characterized for drug resistance to two or three of the above mencioned drugs, were capable to transfer its resistance markers to the receipient strains, remaining the S—C resistant strains enable to do so.

INTRODUÇÃO

Após OCHIAI *et alii*¹⁴ e AKIBA *et alii*¹ terem demonstrado que a resistência múltipla a drogas, em amostras de *Escherichia coli* isoladas do homem, poderia ser transferida em bloco para uma *Shigella* sensível, e que para este acontecimento, era necessário o contacto direto da célula doadora com a célula receptora, ficou definitivamente provada a existência de um novo fenômeno no campo da bacteriologia, fenômeno este que diferia da então conhecida resistência cromossômica. Esta resistência múltipla foi posteriormente

designada “resistência infecciosa” em virtude da facilidade com que se transferia, e o bloco formado pelos gens de resistência e pela partícula de transferência, fator R (Resistance). Por outro lado, a partícula de transferência foi designada RTF (Resistance Transfer Factor^{11,21}). Recentemente, este último componente foi ainda denominado fator t (CHABERT & LE MINOR⁵) e TF (Transference Factor³).

Com a descoberta desse fator controlador da resistência extracromossômica, grupos de investigadores como WATANABE¹⁹ e MITSUHASHI *et alii*^{1,2}, no Japão;

(1) Realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, SP.
(2) Do Departamento de Patologia da F.C.M.B.B.

CHABBERT & LE MINOR^{5,6}, na França; ANDERSON & DATTA⁴ na Inglaterra; KABIN & COHEN⁹, nos Estados Unidos; FERNANDES⁷, FERNANDES & TRABULSI⁸, no Brasil, estudaram, de maneira pormenorizada, diferentes aspectos da resistência infecciosa a drogas. Inclue esta análise a natureza molecular do fator R, sua classificação e distribuição, os mecanismos bioquímicos da resistência, a frequência da transferência da resistência, drogas comprometidas e modelos de resistência, a estabilidade e a perda da transmissibilidade da resistência, a coexistência da resistência infecciosa e da cromossômica.

Considerando que os estudos sobre resistência infecciosa a drogas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de animais constitui uma colaboração ao aspecto de problema até o momento ainda não investigado entre nós, relatamos no presente trabalho os resultados obtidos com 375 linhagens de *Escherichia coli*, relativamente à frequência com que são encontrados os fatores de resistência nessas amostras.

No desejo de tornar mais fácil a redação do trabalho, representaremos as drogas pelas siglas assim caracterizadas:

- S = Sulfadiazina
- T = Tetraciclina
- E = Estreptomina
- Cl = Cloranfenicol
- C = Cefalotina
- K = Kanamicina
- H = Hetacilina

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras doadoras

O presente estudo foi realizado com 375 amostras de *Escherichia coli* obtidas de animais. De acordo com a origem, estas amostras foram classificadas como aviárias, bovinas, eqüinas, ovinas e suínas, pertencendo a cada grupo de animais 75 amostras. A seleção das linhagens doadoras ficou subordinada a uma determinação preliminar de seus níveis de resistência à sulfadiazina, ao sulfato de estreptomina, ao cloranfenicol, à cefalotina sódica, à

hetacilina potássica, ao cloridrato de tetraciclina e ao sulfato de kanamicina, variando-se as concentrações das drogas de 1 a 1 000 µg/ml. Nessas condições, consideramos resistentes e, obviamente, doadoras as amostras que proliferaram em 20 µg/ml ou mais das drogas empregadas.

2. Amostras receptoras e indicadoras

Foram utilizadas, como receptoras, as seguintes linhagens:

2.1 *Escherichia coli* K 12, 712 R, não fermentadora da lactose, resistente a 1 000 µg/ml de estreptomina e sensível a 1 µg/ml de cloranfenicol, sulfadiazina, tetraciclina, kanamicina, cefalotina e hetacilina;

2.2 *Escherichia coli* K 12, J-5, F⁻, fermentadora da lactose, auxotrófica para prolina e metionina, sensível a 5 µg/ml de cloranfenicol e 1 µg/ml de sulfadiazina, estreptomina, ao cloranfenicol, à cefalotina sódica, à 50 µg/ml de ácido nalidíxico.

Foram empregadas, como indicadoras, as seguintes linhagens:

2.3 *Escherichia coli* K 12, 712 R (conforme descrita em 2.1);

2.4 *Escherichia coli* 0111:B4 resistente a 1 000 µg/ml de kanamicina;

2.5 *Escherichia coli* 0111:B4, sensível a 5 µg/ml de sulfadiazina.

3. Verificação da transferência da resistência

Foram empregados dois tipos de receptores:

3.1 *Escherichia coli* K 12, J-5, para as amostras resistentes à estreptomina (conforme 2.2).

3.2 *Escherichia coli* K 12, 712 R, para as amostras sensíveis à estreptomina (conforme 2.1).

3.3 Preparo das linhagens doadoras e receptoras.

Para este fim utilizou-se o Brain-Heart Infusion^(*), onde as linhagens doadoras e receptoras foram, cultivadas por 20 horas a 37°C. A seguir pipetou-se 0,1 ml de cada cultura, misturando-se as mesmas em 10 ml do meio acima referido. Estas manobras tinham como finalidade precípua desencadear o pro-

(*) Oxoid

cesso de conjugação. Todos os tubos inoculados foram colocados em estufa durante quatro horas a 37°C.

3.4 Seleção das linhagens receptoras que receberam resistência:

O meio escolhido para esta seleção foi o MacConkey Agar nº 3(*), onde 0,1 ml da cultura mista foi semeado. Nos cruzamentos entre *Escherichia coli* isoladas de animais e *Escherichia coli* K 12, J-5 (conforme 2.2), as placas seletoras, além das drogas a serem testadas, continham, ainda, ácido nalidíxico na concentração de 25 µg/ml.

Quando do emprego da linhagem K 12, 712 R, adicionaram-se às placas de Petri 25 µg/ml de estreptomina. As concentrações de cada droga nas placas seletoras foram de: 20 µg/ml de tetraciclina, estreptomina, cloranfenicol, kanamicina, cefalotina, hetacilina e sulfadiazina. A possível atividade antagonista entre as linhagens doadoras e receptoras foi despistada através de inoculação da cultura mista em placas de Petri, contendo MacConkey Agar nº 3(*), sem droga. Todas as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Obtida a purificação das amostras receptoras que receberam a resistência, cinco colônias de cada placa foram isoladamente semeadas em Brain-Heart Infusion(*), procedendo-se a seguir à determinação do nível de resistência recebido. Para tanto, a incubação das amostras em estudo foi o conteúdo de alça de platina, de 2 mm de diâmetro, retirado de cultura de 20 horas a 37°C em Brain-Heart Infusion(*) e diluída a 1/1 000, no mesmo meio.

Em cada placa semearam-se 15 amostras de culturas receptoras e empregou-se, como controle da atividade das drogas, uma linhagem indicadora, cujos níveis de resistência foram previamente determinados. Assim, utilizou-se a linhagem descrita em 2.3 como controle de: tetraciclina, cefalotina, hetacilina, cloranfenicol e estreptomina; a descrita em 2.4, como controle de kanamicina; e a descrita em 2.5, como controle de sulfadiazina. Usou-se ainda uma placa testemunha da viabilidade das culturas, contendo somente o meio de cultivo. Os resultados foram registrados após 20 horas de incubação a 37°C e considerou-se como con-

centração inibitória aquela que impedia o desenvolvimento do microrganismo. A concentração imediatamente inferior, que permitia o crescimento das culturas em estudo, indicava o nível de resistência recebido.

RESULTADOS

As linhagens doadoras monorresistentes e as polirresistentes, cruzadas com as linhagens *Escherichia coli* K 12, J-5 (conforme 3.1) e *Escherichia coli* K 12, 712 R (conforme 3.2) oferecem as informações contidas no quadro I. É nítida aí a competência das amostras S-C1-T, S-C1-T-E, S-T-E, S-C1 e S-T, no que concerne à transferência de resistência. Nota-se, ainda, que 192 amostras transferiram resistência (51,20%), não o fazendo 183 amostras (48,80%). Nenhuma das amostras contendo em seus modelos marcadores para kanamicina transferiu resistência, o mesmo ocorrendo com as amostras monorresistentes para a sulfadiazina, o cloranfenicol e a tetraciclina.

No quadro II ordenaram-se especificamente as 192 amostras que transferiram resistência. Verifica-se que a transferência de resistência foi constante para as diferentes espécies animais, isto é, a transferência não variou em função da espécie. O teste utilizado foi o qui-quadrado e encontrou-se o valor de $X^2=2,635$ que, comparado com o valor crítico desta estatística para $\alpha=0,05$ (teste bicaudal) e quatro graus de liberdade, mostrou-se não significante.

O quadro III fornece as informações suficientes para realçar a competência das amostras com marcadores de resistência para S-C1-T, S-C1-T-E, S-T-E, S-T, S-C1, C1-T, S-C1-E. Embora algumas amostras tenham dado origem a vários tipos de descendentes — segregantes, uns, e outros com transferência parcial — contribuíram também com o maior número de unidades que transferiram totalmente seus marcadores. Este fato ocorreu com 80 amostras S-C1-T, 21 S-C1-T-E, 10 S-T, 9 S-C1, 5 S-T-E, 2 C1-T e uma S-C1-E. Relativamente aos modelos S-C1-T-E, S-C1-T e S-T, a transferência total diferiu significativamente ao nível adota-

(*) Oxoid

QUADRO I

Escherichia coli, em 375 amostras, isoladas das espécies animais estudadas e conjugadas com *Escherichia coli* K 12, 712 R e *Escherichia coli* K 12, J-5, ácido nalidíxico resistente, segundo o modelo e a natureza da transferência da resistência. São Paulo, 1972

Espécie	Modelo de Resistência	Número de Amostras	Transferência	
			Positiva	Negativa
			Nº	Nº
<i>Escherichia coli</i>	S-C1-T-E-C-H	1	1	0
" "	S-C1-T-C-E	2	0	2
" "	S-C1-T-C-H	1	1	0
" "	S-C1-T-E	45	25	20
" "	S-C1-T-C	9	4	5
" "	S-C1-T-K	2	0	2
" "	S-C1-T-H	2	0	2
" "	S-C1-H-C	1	0	1
" "	S-C1-T	132	126	6
" "	S-C1-E	10	1	9
" "	S-C1-C	4	0	4
" "	S-T-E	16	8	8
" "	S-C1-H	2	2	0
" "	S-C1	50	11	39
" "	S-T	52	11	41
" "	C1-T	19	2	17
" "	S-C	1	0	1
" "	S	3	0	3
" "	C1	20	0	20
" "	T	3	0	3
Total	20	375	192	183

QUADRO II

Transferência de resistência em 375 amostras de *Escherichia coli*, segundo a espécie animal. São Paulo, 1972

Espécie Animal	Número de Amostras	Amostras que transferiram resistência		Amostras que não transferiram resistência	
		Nº	%	Nº	%
Aves	75	38	50,7	37	49,3
Bovinos	75	43	57,3	32	42,7
Equínos	75	34	45,3	41	54,7
Ovinos	75	33	44,0	42	56,0
Suínos	75	44	58,7	31	41,3
Total	375	192	51,2	183	48,8

QUADRO III

Escherichia coli, em 192 amostras, isoladas das espécies animais, de acordo com o modelo e o grau de transferência de resistência. São Paulo, 1972

Modelo de Resistência	Número de Amostras	Transferência Parcial		Transferência Total		Segregação		X ²
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	
S-C1-T-E-C-H	1	1	0,52	0	0,00	0	0,00	0,0
S-C1-T-C-H	1	1	0,52	0	0,00	0	0,00	0,0
S-C1-T-E	25	0	0,00	21	10,94	4	2,08	10,24
S-C1-T-C	4	4	2,08	0	0,00	0	0,00	2,25
S-C1-T	126	20	10,43	80	41,66	26	13,55	8,64
S-C1-E	1	0	0,00	1	0,52	0	0,00	0,0
S-T-E	8	1	0,52	5	2,60	2	1,04	0,12
S-C1-H	2	2	1,04	0	0,00	0	0,00	0,50
S-C1	11	2	1,04	9	4,69	0	0,00	3,27
S-T	11	1	0,52	10	5,21	0	0,00	5,82
C1-T	2	0	0,00	2	1,04	0	0,00	0,50
Total	192	32	16,67	128	66,66	32	16,67	

QUADRO IV

Número de amostras de *Escherichia coli* que transferiram totalmente seus marcadores, segundo o modelo e a espécie animal. São Paulo, 1972

Modelo	Total de Amostras	Ave Nº	Bovino Nº	Eqüino Nº	Ovino Nº	Suíno Nº	X ²
S-C1-T-E	21	2	2	3	2	12	18,3
S-C1-T	80	18	20	10	8	24	11,5
S-T-E	5	0	0	5	0	0	20,0
S-C1-E	1	0	0	0	0	1	4,0
S-T	10	2	0	8	0	0	24,0
S-C1	9	3	6	0	0	0	16,0
C1-T	2	0	2	0	0	0	8,0

QUADRO V

Número de amostras de *Escherichia coli* que transferiram resistência segundo a droga considerada e a espécie animal, em 128 amostras que transferiram totalmente seus marcadores. São Paulo, 1972

Drogas	Ave	Bovino	Eqüino	Ovino	Suíno	Total	X ²
	Nº	Nº	Nº	Nº	Nº		
Sulfadiazina	25	28	26	10	37	126	15,0
Tetraciclina	22	24	26	10	36	118	14,7
Cloranfenicol	23	30	13	10	37	113	22,7
Estreptomomicina	2	2	8	2	13	27	18,3

QUADRO VI

Modelos de amostras doadoras competentes que transferiram parte de seus marcadores. São Paulo, 1972

Modelos de Resistência	Número de Amostras	Transferência			
		Positiva		Negativa	
		Modelos	Nº	Modelos	Nº
S-C1-T-E-C-H	1	S-C1-T-E	1	C-H	1
S-C1-T-C-H	1	S-C1-T	1	C-H	1
S-C1-T-C	4	S-C1-T	4	C	4
S-C1-T	20	S	14	T	—
		C1	6	—	20
S-T-E	1	S-T	1	E	1
S-C1-H	2	S-C1	2	H	2
S-C1	2	S	2	C1	2
S-T	1	S	1	T	1

do de $\alpha = 0,05$ da transferência parcial ou segregação, sendo que nos modelos citados predominou a transferência total. O teste empregado foi o qui-quadrado, com um grau de liberdade.

Distribuíram-se, no quadro IV, as 128 amostras correspondentes aos sete modelos que foram totalmente transferidos. Este quadro demonstra que os modelos S-C1-T-E, S-C1-T, S-T-E, S-T e S-C1 apresentaram transferências totais que variaram de acordo com a espécie animal. Os modelos S-C1-E e C1-T, ao contrário, apresentaram transferências que não variaram em função da espécie animal. No quadro V observa-se que somente quatro drogas foram transferidas, verificando-se, ainda, que a transferência variou para as diferentes espécies animais, quaisquer que tenham sido as drogas empregadas. A análise estatística dos quadros IV e V foi realizada através do teste do qui-quadrado, com quatro graus de liberdade, e $\alpha = 0,05$ como nível de rejeição, sendo o teste bicaudal. Reuniram-se, no quadro VI, as 32 amostras que transferiram parcialmente a resistência.

Observou-se evidente variação nos níveis de resistência das culturas doadoras. Para as diferentes drogas, esses valores oscilaram entre 1 000 e 20 $\mu\text{g/ml}$, para a sulfadiazina; entre 1 000 e 50 $\mu\text{g/ml}$, para o cloranfenicol; entre 500 e 20 $\mu\text{g/ml}$, para tetraciclina; entre 200 e 20 $\mu\text{g/ml}$, para a estreptomina. Além disto,

permitiu revelar que 126 amostras transferiram resistência à sulfadiazina, 113 ao cloranfenicol, 118 à tetraciclina e 27 à estreptomina.

DISCUSSÃO

Reconhecemos que a utilização abusiva e indiscriminada de antibióticos e quimioterápicos na produção de alimentos de origem animal tem contribuído, de maneira decisiva, para aumentar o espectro de resistência das bactérias intestinais^{15,16,17}.

Este fenômeno provavelmente decorre da facilidade com que os germes entéricos adquirem fatores R e do desequilíbrio ecológico provocado por essas drogas, ao eliminarem os competidores naturalmente sensíveis. A problemática do assunto complica-se ainda mais quando existe a possibilidade de bactérias comensais transferirem seus fatores de resistência para microrganismos patogênicos, vindo estes, por sua vez a ter condições para alcançar o homem como um hospedeiro secundário. Esta última consequência foi sugerida por ANDERSON & DATTA⁴ ao verificarem que linhagens de *Salmonella thyphimurium* resistentes à ampicilina e à tetraciclina, isoladas do homem, deveriam ter-se originado de suínos que consumiram alimentos suplementados com penicilina e tetraciclina, porque linhagens do mesmo fagotipo e com o mesmo espectro de resistência foram obtidas de suínos durante o mesmo período. ANDER-

SON², em recente revisão sobre resistência a drogas em enterobactérias, assinala ser um erro aceitar que o único perigo para o homem permaneça na transmissão de organismos patogênicos resistentes, como a *Salmonella typhimurium*, pois grande parte desse perigo provém da *Escherichia coli* não patogênica, a qual deve manter a comunicação homem-animal em grande escala. Embora aceitando a validade de tais informações, não foi possível assemelhar os nossos resultados aos obtidos a partir de enterobactérias isoladas do homem^{7, 18, 22}, por existirem diferenças quantitativas e qualitativas nos espectros de resistência às diferentes drogas. É provável que os resultados obtidos por ANDERSON & DATTA⁴ e ANDERSON², no que diz respeito à possível transferência de clones resistentes das amostras bacterianas de origem animal para as humanas, sejam válidas apenas para as linhagens por eles estudadas.

Lamentavelmente não foi possível comparar devidamente nossos resultados quanto à frequência dos fatores R com os de outros autores, em virtude da existência de poucos trabalhos semelhantes ao nosso. MITSUHASHI, HASHIMOTO & SUZUKI¹², investigando fatores R em 332 linhagens de *Escherichia coli*, isoladas de suínos (278 amostras) e de aves (54 amostras), relativamente ao cloranfenicol, à tetraciclina, à dihidroestreptomicina e à sulfadiazina, assinalam, para ambas as espécies, a maior frequência do modelo S-T-E. Encontram ainda fatores transferíveis em 40 e 22% das amostras isoladas de suínos e aves, respectivamente. Nossos dados acusam, para as espécies indicadas, fatores R transferíveis em 58,7% e 50,7% (quadro II), com predominância do modelo S-C1-T, seguido do S-C1-T-E, para ambas as espécies. Mesmo com relativas variações nos valores percentuais, os fatores R por nós caracterizados como S-C1-T-E, S-T-E, S-T e S-C1 foram também assinalados no Japão, em suínos e aves¹².

Ainda com relação aos prováveis fatores R caracterizados, indicamos no quadro I, a ocor-

rência dos modelos tetra (S-C1-T-E, S-C1-T-C, S-C1-T-K, S-C1-T-H e S-C1-H-C), penta (S-C1-T-C-H e S-C1-T-C-E) e hexarresistentes (S-C1-T-E-C-H), nos quais são notórias a homogeneidade e a constância dos gens marcadores para S-C1-T, obtendo estes a prevalência quase absoluta nos modelos com multiresistência. Tal fato é, provavelmente, justificado pela eleição destas drogas como suplemento de rações e decorrente de seu uso sistemático em terapêutica veterinária.

A análise do quadro I e o confronto deste com o quadro III satisfazem plenamente à afirmativa de que as linhagens com resistência para duas drogas apresentaram-se com competência semelhante à daquelas com três e quatro marcadores, fazendo exceção à regra o modelo S-C, em que não ocorreu o fenômeno da transferência. Queremos ainda chamar a atenção para o fato de que amostras com marcadores para S-C1-T-C-E, S-C1-E e C1-T, em aves; S-C1-T-H, S-C1-H-C, S-C1-C, em bovinos; S-C1-T-H, S-C1-T-C, S-C1-E, S-T-E, S-C1 e C1-T, em ovinos; S-C1-T-K, em eqüinos; S-C1-T-C, S-C1-C, S-C1, S-T, em suínos, embora não tivessem transferido resistência, possuíam marcadores que foram transferidos pelas culturas competentes. Desta maneira, não encontramos outra possibilidade de explicar tal fenômeno a não ser pela ausência de um elemento transferidor nessas linhagens. Linhagens resistentes e desprovidas do fator de transferência têm sido assinaladas por ANDERSON³, LEWIS¹⁰, WATANABE²¹ e FERNANDES⁷.

No que diz respeito à dinâmica da transferência de resistência, torna-se difícil explicar a segregação por parte de modelos competentes como os apresentados no quadro III. Nota-se, neste quadro, que determinado número de linhagens com marcadores para S-C1-T, S-C1-T-E e S-T-E, que obtiveram considerável porcentagem na transferência total, também segregaram. Em outras palavras, esses

modelos foram transferidos totalmente e separadamente, oferecendo, neste último caso, uma série de descendentes. Assim sendo, só podemos justificar os presentes fatos por uma fragmentação do bloco que contém os gens marcadores ou, ainda, como decorrência de dois ou mais fatores R com diferentes marcadores de resistência em uma só cultura. Esta última justificativa tem sido provada por ANDERSON³ e CHABBERT & LE MINOR^{5,6}. Outra informação obtida a partir do quadro VI é a que refere o fato de 24 culturas (20 S—C1—T, uma S—T—E, duas S—C1 e uma S—T) deixarem de transferir os marcadores T ou E e C1, transferindo os demais. A ausência de transferência para esses marcadores sugere que nas culturas doadoras havia, possivelmente, coexistência de resistência infecciosa e cromossômica, pois, sendo linhagens competentes, não haveria razão para transferirem somente parte de seus marcadores.

Não pudemos observar diferenças significantes entre *Escherichia coli* K 12, J-5 e *Escherichia coli* K 12, 712R, no que diz respeito à transferência de resistência. Esses receptores comportaram-se com homogeneidade em relação ao fenômeno, oferecendo níveis de resistência inferiores ou iguais aos das culturas doadoras. FERNANDES⁷ encontra em *Escherichia coli* níveis inferiores, iguais ou superiores aos de shigelas doadoras. Não observa, porém o mesmo fenômeno quando do cruzamento entre linhagens de *Escherichia coli*. Para estas, os níveis expressos pela receptora foram semelhantes aos das doadoras. Não se conhece convenientemente a influência do hospedeiro no fenômeno da transferência de resistência.

RESUMO

MORENO, G. — Resistência infecciosa a drogas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de animais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 47-55, 1972.

Determinaram-se os níveis de resistência à sulfadiazina, cloranfenicol, tetraciclina, kanamicina, cefalotina, hetacilina e estreptomina de 375 amostras de *Escherichia coli* obtidas de animais. A verificação de resistência infecciosa, nas amostras doadoras, foi feita através

de cruzamento com linhagens de *Escherichia coli* K 12 (K 12, 712 R e K 12, J-5 F⁻).

A análise dos resultados demonstrou que a maioria das amostras de *Escherichia coli* comportou-se com resistência simultânea a duas drogas, predominando as amostras resistentes a três drogas. Em todas as espécies animais estudadas, o fator R predominante, em *Escherichia coli* fez-se representar pelo modelo S—C1—T. Nenhuma das amostras com marcadores para hetacilina, cefalotina ou kanamicina transferiu resistência, o mesmo ocorrendo com as amostras monoresistentes para sulfadiazina, cloranfenicol e tetraciclina. As amostras com resistência simultânea para duas drogas comportaram-se com competência semelhante à daquelas com três e quatro marcadores de resistência, fazendo exceção o modelo S—C, onde não ocorreu o fenômeno de transferência de resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKIBA, T.; KOYAMA, K.; ISHIKI, Y.; KIMURA, S. & FUKUSHIMA, T. On the mechanism of the development of multiple drug-resistance clones of *Shigella*. *Jap. J. Microbiol.*, 4: 219-227, 1960. Apud WATANABE²¹
2. ANDERSON, E. S. — The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 22: 131-180, 1968.
3. ANDERSON, E.S. — Facteurs de transfert et résistance aux antibiotiques chez les entérobactériens. *Annls Inst. Pasteur (Paris)*, 112: 547-563, 1967.
4. ANDERSON, E.S. & DATTA, N. — Resistance to penicillins and its transfer in *Enterobacteriaceae*. *Lancet*, 1: 407-409, 1965.
5. CHABBERT, Y.A. & LE MINOR, L. — Transmission de la résistance a plusieurs antibiotiques chez les entérobactériaceae. I. Définition — Bactériologie générale du transfert. *Presse Méd.*, 74 (47): 2407-2410, 1966.
6. CHABBERT, Y.A. & LE MINOR, L. — Transmission de la résistance a plusieurs antibiotiques chez les entérobactériaceae. II. Bactériologie générale de la résistance (suite). Rôle clinique. *Presse Méd.*, 74(48): 2479-2484, 1966.

7. FERNANDES, M.R.F. — *Resistência infecciosa a drogas em culturas de Shigella*. São Paulo, 1968. [Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]
8. FERNANDES, M.R.F. & TRABULSI, L.R. — Infectious resistance in pathogenic enteric organisms isolated in São Paulo, Brazil. (Preliminary report). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 10:52-53, 1968.
9. KABIN, S.A. & COHEN, S. — Resistance transfer factor in *Enterobacteriaceae*. *New Engl. J. Med.*, 275:248-252, 1966.
10. LEWIS, M.J. — Transferable drug resistance and other transferable agents in strains of *Escherichia coli* from two human populations. *Lancet*, 1: 1389-1393, 1968.
11. MITSUHASHI, S. — Transmissible drug-resistance factor R. *Gunma J. Med. Sci.*, 14: 169-209, 1965.
12. MITSUHASHI, S.; HASHIMOTO, H.; EGAWA, R.; TANAKA, T. & NAGAY, Y. Drug resistance of enteric bacteria. IX. Distribution of R factors in gram-negative bacteria from clinical sources. *J. Bact.*, 93(4): 1242-1245, 1967.
13. MITSUHASHI, S.; HASHIMOTO, H. & SUZUKI, K. — Drug resistance of enteric bacteria. XIII. Distribution of R factors in *Escherichia coli* strains isolated from livestock. *J. Bact.*, 94(4): 1166-1169, 1967.
14. OCHIAI, K.; YAMANAKA, T.; KIMURA, K. & SAWADA, O. — Studies on inheritance of drug resistance between *Shigella* strains and *Escherichia coli* strains. *Nippon Iji Shimpo*, 1861: 34-46, 1959. Apud WATANABE, T.²¹.
15. , RENAUT, L. & MAIRE, C.L. — Evolution de l'antibiosensibilité des sources pathogènes d'*Escherichia coli* d'origine porcine et aviaire. *Cah. Med. Vét.*, 38: 197-203, 1969.
16. SMITH, D.H. — Veterinary implication for transfer activity. In: WOLSTENHOLME G.E.W. & O'CONNOR, M., ed. — *Bacterial episomes and plasmids*. London, Churchill, 1969. p. 213 - 216. [Ciba Foundation Symposium].
17. SMITH, H.W. & CRABB, W.E. — The effect of the continuous administration of diets containing low levels of tetracyclines on the incidence of drug-resistant *Bacterium coli* in the faeces of pigs and chickens: the sensitivity of the *Bacterium coli* to other chemotherapeutic agents. *Vét. Rec.*, 69: 24-30, 1957.
18. TRABULSI, L.R. & ZULIANI, M.E. — Estudos sobre a *E.coli* 0111:B4. III. Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e a seis antibióticos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 11: 323-324, 1969.
19. WATANABE, T. — Infectious drug resistance. *Scient. Am.*, 217(6): 19-27, 1967.
20. WATANABE, T. — Infectious drug resistance in enteric bacteria. *New Engl. J. Med.*, 275: 888-894, 1966.
21. WATANABE, T. — Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bact. Rev.*, 27: 87-115, 1963.
22. ZULIANI, M.E. & TRABULSI, L.R. — Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e a 5 antibióticos de 166 amostras de *Shigella* isoladas em São Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 10: 70-77, 1968.

Recebido para publicação em 26 de maio de 1972.

RESISTÊNCIA A DROGAS EM ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE ANIMAIS SILVESTRES (1)

DRUG RESISTANCE AMONG ENTERIC BACTERIA STRAINS ISOLATED FROM
MAMMALIANS ENCOUNTERED IN WOODEN REGIONS OF BOTUCATU, BRAZIL

GILBERTI MORENO⁽²⁾
DARCI S. AOKI WATANABE⁽²⁾
NORMA GERUSA S. SILVA⁽²⁾
CARLOS ALBERTO DE MAGALHAES LOPES⁽²⁾
EUNICE SEABRA⁽²⁾
CLAUDINE GRANADO⁽²⁾

SUMMARY

MORENO, G.; WATANABE, D.S.A.; SILVA, N.G.S.; LOPES, C.A.M.; SEABRA, E. & GRANADO, C. — Drug resistance among enteric bacteria strains isolated from mammals encountered in wooden regions of Botucatu, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 57-61, 1972.

82 strains of enteric bacteria isolated from several species of Brazilian mammals encountered in most wooden regions of Botucatu, were screened for drug resistance. The selection of the strains was carried out by its levels resistance to sulphadiazine, to Kanamycine sulphate, to chloramphenicol, to cephalotin, to hetacylin, to tetracycline, and to streptomycin sulphate. At various concentrations employed, it was possible to check distinctives strains populations, one drug resistant and other drug sensitive.

Relatively to streptomycin sulphate it was founded only one sensitive strain population.

Finally, it was observed that 29 *E. coli* strains, 27 *Proteus* sp. strains, and 2 *Salmonella* sp. strains appeared to be only sulphadiazine resistant.

INTRODUÇÃO

Mesmo considerando o grande número de trabalhos existentes no campo da resistência a drogas em bactérias, poucas são as comunicações mais diretamente ligadas a medicina veterinária, particularmente aquelas relacionadas ao estudo de amostras de enterobactérias obtidas de animais domésticos⁵. Tratando-se de animais silvestres, não encontramos na literatura nacional nenhuma contribuição científica relativa ao problema da resistência à droga, sendo a finalidade do presente trabalho a apresentação de resultados preliminares, relativos ao encontro de amostras resistentes de entero-

bactérias isoladas de animais silvestres, no Município de Botucatu.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Origem das amostras

Foram estudadas 82 amostras de enterobactérias isoladas de animais silvestres da região de Botucatu. Segundo a procedência, essas amostras, foram assim distribuídas: 29 gambás, 62 amostras; 16 ratos, 17 amostras; um preá, uma amostra; e um ouriço, duas amostras.

(1) Realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, S.P.

(2) Do Departamento de Patologia da F.C.M.B.B.

2. Isolamento e caracterização bioquímica

As coproculturas tiveram como seqüência a semeadura do material em tetracionato adicionado de verde brilhante na concentração final de 1:100.000. Decorridas 24 horas de estufa a 37°C, semearam-se placas de Petri contendo o meio de ágar verde brilhante, o de Mac Conkey e o de ágar sulfito de bismuto, e selecionaram-se, em tríplice açúcar com ferro, colônias fermentadoras e não fermentadoras da lactose.

A caracterização bioquímica dos microrganismos foi feita segundo normas estabelecidas por EDWARDS & EWING¹ e pesquisaram-se as seguintes provas: indol, V.M., V.P., urease, citrato de Simmons, KCN, motilidade, redução de nitrato a nitrito, descarboxilação da lisina, arginina e ornitina, desaminação da fenil alanina e gás em glicose.

3. Identificação sorológica

A partir de cultura de ágar simples determinou-se a leitura antigênica dos microrganismos isolados, empregando-se, para tanto, soro preparado⁽¹⁾, quando se tratava de cultura suspeita de salmonella. Para as amostras de *Escherichia coli*, a subdivisão de enteropatógenicas e não enteropatógenicas teve por base os resultados das provas de aglutinação com os soros: 026:B6, 055:B5, 086:B7, 0127:B8, 0111:B4 e 0119:B14.

4. Determinação da sensibilidade a antibióticos e à sulfadiazina

Empregou-se o método da diluição em placa. As soluções de cloridrato de tetraciclina (T), hetacilina potássica (H), sulfato de kanamicina (K), sulfato de estreptomina (E), cloranfenicol (Cl), cefalotina sódica (C) e sulfadiazina (S), foram preparadas no dia do uso e continham 10 mg da base de cada droga por ml. Utilizou-se Agar Lab Lemco⁽²⁾ como meio de cultura a fim de testar a atividade dos antibióticos e o Agar Lab Lemco⁽²⁾ sem cloreto de sódio acrescido de sangue de cavalo a

5%, quando do emprego da sulfadiazina⁴. A concentração final das drogas, nas placas, variou de 1 µg/ml a 1 000 µg/ml.

A semeaduras das amostras em estudo foi conteúdo de uma alça de platina de 2 mm de diâmetro retirado de cultura de 24 horas a 37°C em Brain-Hearth Infusion⁽²⁾ e diluída a 1/1 000 no mesmo meio. Em cada placa foram estudadas 15 amostras e empregou-se, como controle da atividade das drogas, uma linhagem de *Escherichia coli*, cujos níveis de resistência foram previamente determinados. Usou-se ainda placa testemunha da viabilidade das culturas, contendo somente o meio de cultura. Os resultados foram anotados após 24 horas de incubação a 37°C. Considerou-se como concentração inibitória aquela que impedia o desenvolvimento do microrganismo. A concentração imediatamente inferior, que permitia o crescimento das culturas, indicava o nível de resistência.

RESULTADOS

Através de provas bioquímicas e sorológicas foi possível caracterizar-se 82 amostras de enterobactérias assim distribuídas: 40 de *Escherichia coli*; 27 de *Proteus* sp.; 13 de *Aerobacter* e 2 de *Salmonella* sp.

Nos quadros I, II e III estão representados os níveis de resistência de *E. coli*, *Proteus* sp. e *Aerobacter* sp. à sulfadiazina, ao cloranfenicol, ao cloridrato de tetraciclina, ao sulfato de estreptomina, ao sulfato de kanamicina, à hetacilina potássica e à cefalotina sódica, no que diz respeito às concentrações das drogas empregadas. A análise dos quadros demonstra que, com exceção das amostras de *Aerobacter* sp., *Escherichia coli* e *Proteus* sp. apresentaram resistência exclusiva à sulfadiazina.

Relativamente aos modelos de resistência encontrados, verificou-se a presença de amostras com multiresistência, predominando aquelas com marcadores para S-C, S-C-H, C-H, Cl-H, quando se tratava de *Aerobacter* sp.; C-T, C-T-H, C-Cl-T-H, C-T-K-H, para *Proteus*, e S-C, S-C-T, em *Escherichia*

(1) Difco Laboratories

(2) Oxoid

QUADRO I

Número de amostras resistentes de E. coli, isoladas de animais silvestres, segundo a droga e concentrações empregadas, Botucatu, 1972

Drogas µg/ml	Sulfadiazina		Cefalotina		Cloranfenicol		Tetraciclina		Kanamicina		Estreptomicina		Hetacilina	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1000	23	57,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
500	4	10,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
200	4	10,0	1	2,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
100	1	2,5	1	2,5	0	0,0	1	2,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
50	1	2,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
20	1	2,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
10	4	10,0	1	2,5	0	0,0	3	7,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
5	1	2,5	37	92,5	0	0,0	28	70,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
1	1	2,5	0	0,0	38	95,0	8	20,0	0	0,0	1	2,5	37	92,5
< 1	0	0,0	0	0,0	2	5,0	0	0,0	40	100,0	39	97,5	3	7,5
Total	40	100,0	40	100,0	40	100,0	40	100,0	40	100,0	40	100,0	40	100,0

QUADRO II

Número de amostras resistentes de Proteus sp., isoladas de animais silvestres, segundo a droga e concentrações empregadas, Botucatu, 1972

Drogas µg/ml	Sulfadiazina		Cefalotina		Cloranfenicol		Tetraciclina		Kanamicina		Estreptomicina		Hetacilina	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1000	27	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
500	0	0,0	1	3,7	0	0,0	3	11,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0
200	0	0,0	4	14,8	0	0,0	3	11,1	0	0,0	0	0,0	3	11,1
100	0	0,0	8	29,6	0	0,0	9	33,3	0	0,0	0	0,0	6	22,2
50	0	0,0	3	11,1	6	22,2	3	11,1	0	0,0	0	0,0	1	3,7
20	0	0,0	3	11,1	0	0,0	6	22,2	1	3,7	1	3,7	8	29,6
10	0	0,0	0	0,0	5	18,5	0	0,0	0	0,0	1	3,7	0	0,0
5	0	0,0	3	11,1	10	37,0	2	7,4	2	7,4	4	14,8	4	14,8
1	0	0,0	2	7,4	6	22,2	1	3,7	13	48,1	19	70,4	2	7,4
< 1	0	0,0	3	11,1	0	0,0	0	0,0	11	40,7	2	7,4	3	11,1
Total	27	100,0	27	100,0	27	100,0	27	100,0	27	100,0	27	100,0	27	100,0

QUADRO III

Número de amostras resistentes de Aerobacter sp., isoladas de animais silvestres, segundo a droga e concentrações empregadas, Botucatu, 1972

Drogas µg/ml	Sulfadiazina		Cefalotina		Cloranfenicol		Tetraciclina		Kanamicina		Estreptomicina		Hetacilina	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1000	10	76,9	4	30,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
500	2	15,4	1	7,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	7,7
200	0	0,0	2	15,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	7,7
100	0	0,0	0	0,0	1	7,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	7,7
50	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	7,7	0	0,0	0	0,0	2	15,4
20	1	7,7	1	7,7	4	30,8	5	38,5	1	7,7	0	0,0	4	30,8
10	0	0,0	2	15,4	1	7,7	5	38,5	1	7,7	2	15,4	2	15,4
5	0	0,0	1	7,7	5	38,5	2	15,4	1	7,7	1	7,7	0	0,0
1	0	0,0	2	15,4	2	15,4	0	0,0	3	23,1	7	53,8	2	15,4
< 1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	7	53,8	3	23,1	0	0,0
Total	13	100,0	13	100,0	13	100,0	13	100,0	13	100,0	13	100,0	13	100,0

coli. Foram isoladas duas amostras de *Salmonella* sp., com resistência exclusiva a 1 000 µg/ml de sulfadiazina.

No quadro IV, reuniram-se duas populações de enterobactérias, uma constituída por amostras sensíveis e outra por amostras resistentes, relativamente aos antibacterianos empregados. Nota-se que 76 amostras apresentaram resistência à sulfadiazina, 28 à cefalotina, 25 à tetraciclina, 29 à hetaciclina, sete ao cloranfenicol e uma à kanamicina. Com relação à estreptomomicina, somente a população sensível foi encontrada.

QUADRO IV

Populações resistente e sensível, segundo a droga, em 82 amostras de enterobactérias isoladas de animais silvestres, Botucatu, 1972

Drogas	Resistente		Sensível	
	Nº	%	Nº	%
Sulfadiazina	76	92,68	6	7,32
Cefalotina	28	34,14	54	65,86
Cloranfenicol	7	8,54	75	91,46
Tetraciclina	25	30,49	57	69,51
Kanamicina	1	1,22	81	98,78
Estreptomomicina	0	0,00	82	100,00
Hetaciclina	29	35,37	53	64,63

Não foram assinaladas amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas relativamente aos soros utilizados.

DISCUSSÃO

Como referimos na introdução deste trabalho, é pobre a literatura veterinária no que tange às pesquisas sobre resistência a drogas em bactérias⁵. Este fato vem dificultando o estudo comparativo de nossos resultados e impossibilitando, até certo ponto, chegarmos a novas conclusões no terreno da resistência aos antibacterianos.

Pela análise dos resultados estabelecidos no presente trabalho, demonstra-se que os animais silvestres, à semelhança do homem e dos animais domésticos, albergam duas populações bacterianas bem individualizadas em relação ao fenômeno da resistência a drogas — uma população resistente e outra sensível. Uma das

populações, a resistente, não é difícil de se caracterizar, uma vez que o encontro de microrganismos resistentes é consequência de mutações espontâneas e ao acaso. Difícil é explicar a seleção desses microrganismos em animais silvestres afastados do uso de drogas antibacterianas, seletoras de mutantes resistentes.

Quanto aos modelos de resistência dos microrganismos isolados, notamos diferenças qualitativas e quantitativas em relação àquelas apresentadas para enterobactérias isoladas do homem^{2,3,6} e para as isoladas dos animais domésticos⁵.

Surpreende-nos, nos animais silvestres, o elevado número de amostras bacterianas com resistência à cefalotina e hetaciclina, visto que esta resistência é numericamente baixa naquelas amostras isoladas do homem^{2,3,6} e de animais⁵.

Fato digno de registro foi o grande número de amostras com resistência exclusiva à sulfadiazina (29 de *Escherichia coli*, 27 de *Proteus* sp., e duas de *Salmonella* sp.).

Particularmente, em relação à baixa resistência à estreptomomicina e à kanamicina, nossos resultados concordam com os apresentados por MORENO⁵ para suínos, bovinos, ovinos, aves e eqüinos.

RESUMO

MORENO, G.; WATANABE, D.S.A.; SILVA, N.G.S.; LOPES, C.A.M.; SEABRA, E. & GRANADO, C. — Resistência a drogas em enterobactérias isoladas de animais silvestres. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 57-61, 1972.

Os autores investigaram quantitativamente a resistência a drogas em 82 amostras de enterobactérias, isoladas de animais silvestres, no Município de Botucatu. A seleção das linhagens bacterianas ficou subordinada a uma determinação de seus níveis de resistência à sulfadiazina, ao sulfato de kanamicina, ao cloranfenicol, à cefalotina sódica, à hetaciclina potássica, ao cloridrato de tetraciclina e ao sulfato de estreptomomicina. Levando-se em consideração os níveis de resistência apresentados, foi possível caracterizar uma população resis-

tente e outra sensível, com relação às seis primeiras drogas. Relativamente ao sulfato de estreptomina, somente uma população sensível foi encontrada.

Resistência exclusiva à sulfadiazina foi observada em 29 amostras de *Escherichia coli* 27 amostras de *Proteus* sp. e duas amostras de *Salmonella* sp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EDWARDS, P. R. & EWING, H. W. — *Identification of enterobacteriaceae*. Atlanta, Ga., Burgess Publ., 1967.
2. FERNANDES, M. R. F. & TRABULSI, L. R. — Infectious resistance in pathogenic enteric organisms isolated in São Paulo, Brasil. (Preliminary report). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 10: 52-53, 1968.
3. FERNANDES, M. R. F. & TRABULSI, L. R. — *Resistência infecciosa a drogas em culturas de Shigella*. São Paulo, 1968. [Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].
4. HARPER, G. J. & CAWSTON, W. C. — The "in vitro" determination of the sulphona-mide sensitivity of bacteria. *J. Path. Bact.*, 57: 59-66, 1945.
5. MORENO, G. — *Resistência infecciosa a drogas em amostras de Escherichia coli isoladas de animais*. São Paulo, 1970. [Tese — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo].
6. ZULIANI, M.E. & TRABULSI, L. R. — Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e a 5 antibióticos de 166 amostras de *Shigella*, isoladas em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 10: 70-77, 1968.

Recebido para publicação em 26 de maio de 1972.

RESISTÊNCIA A DROGAS EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI*
ISOLADAS DE ANIMAIS (1)

DRUG RESISTANCE IN *ESCHERICHIA COLI*
STRAINS ISOLATED FROM ANIMALS

GILBERTI MORENO (2)

SUMMARY

MORENO, G. — Drug resistance in *Escherichia coli* strains isolated from animals. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 63-68, 1972.

It were screened for drug resistance 375 *E. coli* strains, isolated from animals. In relation to the origin, they were obtained from fowls, calves, horses, lambs and swine, corresponding a total of 75 strains to each of these related groups.

The bacterial lineage selection was dependant on a preliminary determination of its resistance levels to the sulphadiazine, to streptomycin, to chloramphenicol, to cephalotin, to hetacylin, to tetracycline, and to the kanamycin.

The concentration of each of these drugs varied from 1 to 1 000 mcg/ml, and it were considered as resistant, those strains that grew in 20 mcg/ml.

In these conditions, it were observed that 333 strains were resistant to sulphadiazine, 284 to tetracycline, 300 to chloramphenicol, 74 to streptomycin, 19 to cephalotyn, seven to hetacylin and two to the kanamycin. From all of these 375 above mentioned *E. coli* strains, were detected 20 resistance models, with the predominance of those integrated by three or four determinants for drug resistance. The S—C1—T resistance model showed higher incidence with a total of 132 strains coming in second place, 45 strains, characterized by the S—C1—T—E resistance determinants.

INTRODUÇÃO

A administração de um antibiótico não deve constituir um simples desempenho mecânico em virtude de ser um dos recursos mais poderosos com que conta o homem no combate aos agentes de infecção. Com o aperfeiçoamento dos métodos microbiológicos e após o advento dos antibióticos de largo espectro, novos horizontes foram abertos no campo da antibioticoterapia tornando possível, indubitavelmente, ampliar com maior segurança e êxito suas indicações. Todavia o problema da

antibioticoterapia em veterinária, a par do que ocorre em medicina humana, oferece ainda hoje sérios obstáculos a preocupar continuamente os que se responsabilizam pela sua prática. Daí compreenderem-se, perfeitamente, as razões pelo seu interesse e o volume considerável de investigações realizadas neste campo.

O presente trabalho analisa, "in vitro" a resistência a drogas em *Escherichia coli* isoladas de animais domésticos, constituindo-se em colaboração até o momento ainda não investigada entre nós.

(1) Realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, Botucatu, SP.

(2) Do Departamento de Patologia da F.C.M.B.B.

MATERIAL E MÉTODOS

1 — Amostras

Foram estudadas 375 amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves, bovinos, suínos, eqüinos e ovinos, pertencendo a cada grupo de animais 75 amostras. A manutenção das amostras foi feita em duplicatas de tubos contendo Lab-Lemco Agar (*), fechados com rolhas de cortiça parafinadas e conservados em geladeira a 4°C.

2 — Determinação do nível de resistência

2.1 Amostras indicadoras

Foram utilizadas, como indicadoras, as seguintes linhagens:

2.1.1 *Escherichia coli* K 12, 712 R, não fermentadora da lactose, resistente a 1 000 µg/ml de estreptomina e sensível a 1 µg/ml de cloranfenicol, sulfadiazina, tetraciclina, kanamicina, cefalotina e hetacilina

2.1.2 *Escherichia coli* 0111:B4, resistente a 1 000 µg/ml de kanamicina;

2.1.3 *Escherichia coli* 0111:B4, sensível a 5 µg/ml de sulfadiazina.

3 — Determinação do nível de resistência

3.1 Preparo das soluções de antibióticos e da sulfadiazina

As soluções dos antibióticos e da sulfadiazina foram preparadas no dia do uso e continham 10 mg da base de cada droga por ml. Dissolveu-se a sulfadiazina em água destilada acrescida de hidróxido de sódio 1 normal; o sulfato de estreptomina, o sulfato de kanamicina e o ácido nalidíxico, em água destilada; o cloranfenicol, em tampão fosfato pH 6 (K₂HPO₄ 0,2g; KH₂PO₄ 0,8g; água destilada 100 ml) e álcool metílico; o cloridrato de tetraciclina, em tampão fosfato pH 4,5 (KH₂PO₄ 1,36g; água destilada 100 ml) e álcool metílico; a hetacilina, em tampão fosfato pH 8 (K₂HPO₄ 16,73g; KH₂PO₄ 0,523g;

água destilada 100 ml) e álcool metílico; e cefalotina sódica, em água destilada e álcool metílico.

3.2 Preparo das placas

As placas de Petri, contendo as substâncias necessárias à determinação do nível de resistência, foram preparadas no dia do uso. Utilizou-se o Lab-Lemco Agar (*) como meio de cultura, quando do emprego dos antibióticos. Relativamente à sulfadiazina, lançou-se mão do Lab-Lemco Agar (*) sem cloreto de sódio, acrescido de sangue de cavalo a 5%. Após a colocação nas placas de Petri, de quantidades variáveis das soluções de antibióticos e da sulfadiazina, necessárias para se atingirem as concentrações desejadas, adicionaram-se às placas o meio de cultura previamente resfriado a 45°C.

No quadro I sumarizam-se as quantidades dos componentes empregados na obtenção da concentração desejada de cada droga.

QUADRO I

Concentração final da droga,
segundo a diluição empregada

Solução da droga (10 mg/ml)	Diluição	Meio de cultura (ml)	Concentração final da droga (µg/ml)
2	—	18,0	1000
1	—	19,0	500
0,4	—	19,6	200
2	1/10	18,0	100
1	1/10	19,0	50
0,4	1/10	19,6	20
2	1/100	18,0	10
1	1/100	19,0	5
0,2	1/100	19,8	1

3.3 Técnica de determinação do nível de resistência

As culturas de *Escherichia coli* a serem usadas em cada ensaio foram preparadas de véspera, semeando-se tubos contendo Brain-Heart Infusion (*), com os microrganismos provenientes das culturas de manutenção. A inoculação das amostras em estudo foi o conteúdo de alça de platina, de 2 mm de diâmetro,

(*) Oxoid

retirado de cultura de 20 horas a 37°C em Brain-Heart Infusion (*) e diluída a 1/1 000 no mesmo meio.

Em cada placa semearam-se 15 amostras de *Escherichia coli* e empregou-se, como controle da atividade das drogas, uma linhagem indicadora, cujos níveis de resistência foram previamente determinados. Assim, a linhagem descrita em 2.1.1, como controle de tetraciclina, cefalotina, hetacilina, cloranfenicol e estreptomicina; a descrita em 2.1.2, como controle de Kanamicina; e a descrita em 2.1.3, como controle de sulfadiazina. Usou-se ainda uma placa testemunha da viabilidade das culturas, contendo somente o meio de cultivo. Os resultados foram registrados após 20 horas de incubação a 37°C e considerou-se como concentração inibitória aquela que impedia o

desenvolvimento do microrganismo. A concentração imediatamente inferior, que permitia o crescimento das culturas em estudo, indicava o nível de resistência. Todas as amostras estudadas foram conservadas em geladeira a 4°C e em duplicatas de tubos contendo Lab-Lemco Agar (*) fechados com rolinhas de cortiça parafinadas.

RESULTADOS

Frequência de amostras resistentes

No quadro II encontram-se os níveis de resistência das diferentes amostras de *Escherichia coli* à sulfadiazina, ao cloridrato de tetraciclina, ao cloranfenicol, ao sulfato de estreptomicina, à cefalotina sódica, à hetacilina

QUADRO II

Resistência às concentrações das drogas empregadas para 375 amostras de Escherichia coli isoladas das espécies animais, Botucatu, 1972

Drogas μ g/ml	Sulfadiazina		Cloranfenicol		Tetraciclina		Estreptomicina		Cefalotina		Hetacilina		Kanamicina	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<1	4	1,1	2	0,5	1	0,3	215	57,5	9	2,4	34	9,1	344	91,7
1	7	1,8	41	10,9	5	1,3	47	12,5	184	49,1	239	63,7	24	6,4
5	18	4,8	27	7,2	32	8,5	17	4,5	89	23,7	91	24,3	3	0,8
10	13	3,5	5	1,3	53	14,0	22	5,9	74	19,7	4	1,1	2	0,5
20	21	5,6	1	0,3	69	18,4	36	9,6	14	3,8	2	0,5	0	0,0
50	16	4,2	22	5,9	32	8,5	25	6,7	3	0,8	2	0,5	0	0,0
100	15	4,0	83	22,1	71	18,9	11	2,9	0	0,0	0	0,0	1	0,3
200	18	4,8	120	32,0	110	29,3	2	0,5	0	0,0	0	0,0	1	0,3
500	25	6,7	58	15,5	2	0,5	0	0,0	0	0,0	1	0,3	0	0,0
1000	238	63,5	16	4,2	0	0,0	0	0,0	2	0,5	2	0,5	0	0,0
Total	375	100,0	375	100,0	375	100,0	375	100,0	375	100,0	375	100,0	375	100,0

QUADRO III

Número de amostras resistentes de Escherichia coli a cada uma das drogas, entre 375 linhagens estudadas, Botucatu, 1972

Drogas	Numero de amostras	%
Sulfadiazina	333	88,8
Cloranfenicol	300	80,0
Tetraciclina	284	75,7
Estreptomicina	74	19,7
Cefalotina	19	5,1
Hetacilina	7	1,9
Kanamicina	2	0,5

lina potássica e ao sulfato de kanamicina, no que diz respeito às concentrações empregadas. Nota-se que os níveis para a sulfadiazina, o cloranfenicol, a cefalotina e a hetacilina variaram entre 1 000 μg/ml e menos do que 1 μg/ml; entre 500 μg/ml e menos do que 1 μg/ml para a tetraciclina; entre 200 μg/ml e menos do que 1 μg/ml para estreptomicina e a kanamicina.

Considerando-se como resistentes as amostras que cresceram em 20 μg/ml ou mais das drogas empregadas verificou-se que 333 amostras apresentaram resistência à sulfadiazina,

(*) Oxoid

284 à tetraciclina, 300 ao cloranfenicol, 74 à estreptomomicina, 19 à cefalotina, 7 à hetacilina e 2 à kanamicina (quadro III).

No quadro IV reuniu-se o número de amostras resistentes de *Escherichia coli* segundo a droga utilizada e a espécie animal. Observa-se

que a resistência variou, conforme a espécie animal, nos casos em que empregamos o cloranfenicol ou a estreptomomicina. Para as demais drogas não notamos diferenças estatisticamente significantes ao nível de rejeição adotado, isto é $\alpha = 0,05$. O teste utilizado foi o do qui-quadrado, com quatro graus de liberdade.

QUADRO IV

Número de amostras resistentes de *Escherichia coli*, segundo a droga considerada e a espécie animal, Botucatu, 1972

Drogas	Ave		Bovino		Eqüino		Suíno		Ovino		X ²
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Sulfadiazina	64	85,3	58	77,3	72	96,0	73	97,3	66	88,0	2,27
Cloranfenicol	65	86,7	74	98,7	33	44,0	74	98,7	54	72,0	19,70
Tetraciclina	55	73,3	43	57,3	68	90,7	52	69,3	66	88,0	7,51
Estreptomomicina	11	14,7	2	2,7	27	36,0	27	36,0	7	9,3	36,27
Cefalotina	4	5,3	6	8,0	2	2,7	5	6,7	2	2,7	3,37
Hetacilina	0	0,0	4	5,3	0	0,0	2	2,7	1	1,3	8,00
Kanamicina	0	0,0	0	0,0	2	2,7	0	0,0	0	0,0	8,00

Modelos de Resistência

No quadro V organizaram-se os diferentes modelos de resistência encontrados nas 375 amostras de *Escherichia coli* obtidas de animais. A análise do quadro oferece dados suficientes para salientar a predominância de amostras com três e quatro marcadores de resistência. O modelo S-C1-T predominou com 132 amostras, vindo logo a seguir 45 amostras caracterizadas como S-C1-T-E, respectivamente 35,2% e 12,0%. Apenas três linhagens apresentaram pentarresistência, duas S-C1-T-C-E e uma S-C1-T-C-H. Houve uma hexarresistente S-C1-T-E-C-H, isolada de suíno. O modelo com dois marcadores que prevaleceu foi o S-T com 52 amostras (13,9%), seguido do S-C1, com 50 amostras (13,3%). O modelo S-C1-T-K somente foi encontrado em duas amostras isoladas de eqüinos. Resistência exclusiva à sulfadiazina foi encontrada em três amostras; à tetraciclina, também em três, e ao cloranfenicol, em 20.

Foi assinalado um total de 20 modelos de resistência para as 375 linhagens estudadas. Relativamente a cada espécie animal foram obtidos: 11 diferentes modelos para bovinos e ovinos, 10 para suínos e nove para aves e

eqüinos, respectivamente. O modelo de resistência predominante para aves, bovinos, ovinos e suínos, fez-se representar pelo S-C1-T. Para os eqüinos predominou o S-T. Seguiram-se-lhes o modelo S-C1, para aves e bovinos; o S-C1-T e T-E, para eqüinos; S-T, para ovinos, e S-C1-T-E, para suínos.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram o encontro de 20 diferentes modelos de resistência nas 375 amostras de *Escherichia coli* isoladas das cinco espécies animais empregadas no presente trabalho. Realmente, a apreciação do quadro V oferece essas informações e torna evidente a alta porcentagem de amostras com resistência múltipla, predominando o modelo S-C1-T, com 132 amostras, vindo a seguir o S-C1-T-E, com 45 amostras. No quadro V notamos a ocorrência de modelos tetra, penta e hexarresistentes, nos quais é notória a constância dos marcadores para S-C1-T. Estes marcadores obtiveram a prevalência quase absoluta nos modelos com multirresistência, sendo tal fato, provavelmente, justificado pela eleição destas drogas em veterinária.

Não estranhamos o altíssimo número de

QUADRO V

Escherichia coli isoladas das espécies animais, de acordo com os modelos de resistência em 375 amostras, Botucatu, 1972

Modelos de Resistência	Aves	Bovino	Equino	Ovino	Suíno	Total de amostras
	Nº	Nº	Nº	Nº	Nº	
S-CI-T-E-C-H	—	—	—	—	1	1
S-CI-T-C-E	2	—	—	—	—	2
S-CI-T-C-H	—	—	—	—	1	1
S-CI-T-E	8	2	13	4	18	45
S-CI-T-C	2	2	1	2	2	9
S-CI-T-K	—	—	2	—	—	2
S-CI-T-H	—	1	—	1	—	2
S-CI-H-C	—	1	—	—	—	1
S-CI-T	27	28	14	34	29	132
S-CI-E	1	—	—	1	8	10
S-CI-C	—	3	—	—	1	4
S-T-E	—	—	14	2	—	16
S-CI-H	—	2	—	—	—	2
S-CI	14	19	—	5	12	50
S-T	10	—	24	17	1	52
CI-T	6	9	—	4	—	19
S-C	—	—	1	—	—	1
S	—	—	3	—	—	3
CI-	5	7	3	3	2	20
T	—	1	—	2	—	3

S=Sulfadiazina; CI=Cloranfenicol; T=Tetraciclina; E=Estreptomicina;
C=Cefalotina; H=Hetacilina; K=Kanamicina.

amostras sensíveis à kanamicina, por considerarmos que a droga não encontrou, ainda, facilidade de prescrição na prática veterinária, e porque, infeliz ou felizmente, cabe ao criador analisar, do ponto de vista econômico, as vantagens ou desvantagens de sua aplicação. Todavia, acreditamos que o seu uso incorreto e desabusado acarretará, forçosamente, a seleção de linhagens bacterianas resistentes ao antibiótico. Este fato foi devidamente comprovado, em nosso meio, por TRABULSI & ZULIANI³, ao trabalharem com amostras de *Escherichia coli* 0111:B4:H2, de origem humana. Verificaram os autores um aumento significativo de amostras resistentes que variou, num período compreendido entre 1963 e 1968, de 29,26% a 88,63%, de 21,95% a 95,45%, e de 48,78% a 97,72%, no que diz respeito ao cloranfenicol, à kanamicina e a tetraciclina, respectivamente.

Particularmente, em relação à resistência à estreptomicina, nossos resultados divergiram percentualmente dos apresentados por SMITH² para suínos, bovinos, ovinos e aves. Enquanto este autor obtém valores equiva-

lentes a 40,0%, 52,0%, 8,0% e 2,9%, os nossos distribuíram-se em 36,0%, 2,7%, 9,3% e 14,7%, respectivamente. Embora a espécie equina não tenha sido incluída no trabalho acima citado, gostaríamos de deixar aqui registrada a percentagem de 36,0% por nós encontrada. TRABULSI & ZULIANI³ registraram valores de até 100% de resistência à estreptomicina para amostras de *Escherichia coli* enteropatógena isoladas do homem.

Fato digno de registro foi a baixa frequência de amostras com resistência a apenas uma droga, comportando-se a maioria das linhagens com blocos contendo marcadores de resistência para três e quatro drogas, respectivamente S-CI-T e S-CI-T-E. Este fenômeno sugere que a resistência infecciosa à droga é quase sempre múltipla, isto é, quando uma bactéria se torna resistente a uma droga, ocorre geralmente resistência a outras. Entre nós esse fenômeno foi inicialmente estudado por FERNANDES¹, ZULIANI & TRABULSI⁴, TRABULSI & ZULIANI³, ao trabalharem com linhagens de shigela e *Escherichia coli* isoladas do homem.

RESUMO

MORENO, G. — Resistência a drogas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de animais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 63-68, 1972.

Determinou-se a sensibilidade de 375 amostras de *Escherichia coli* isoladas de animais. De acordo com a origem, estas amostras foram rotuladas como aviárias, bovinas, eqüinas, ovinas e suínas, pertencendo a cada grupo de animais 75 amostras.

A seleção das linhagens bacterianas ficou subordinada a uma determinação preliminar de seus níveis de resistência à sulfadiazina, ao sulfato de estreptomina, ao cloranfenicol, à cefalotina sódica, à hetacilina potássica, ao cloridrato de tetraciclina, ao sulfato de kanamicina e ao sulfato de estreptomina, variando-se as concentrações das drogas de 1 a 1 000 µg/ml. Consideram-se como resistentes as amostras que proliferaram em 20 µg/ml ou mais das drogas empregadas. Nessas condições, verificou-se que 333 amostras apresentaram resistência à sulfadiazina, 284 à tetraciclina, 300 ao cloranfenicol, 74 à estreptomina, 19 à cefalotina, 7 à hetacilina e 2 à kanamicina.

Foi assinalado um total de 20 modelos de resistência nas 375 amostras estudadas, prevalecendo aquelas com três e quatro marcadores de resistência. O modelo S-C1-T predominou com 132 amostras, vindo logo a seguir 45 amostras rotuladas como S-C1-T-E.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FERNANDES, M.R.F. — *Resistência infecciosa a drogas em culturas de Shigella*. São Paulo, 1968. [Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].
2. SMITH, D.H. — Veterinary implications of transfer activity. In: WOLSTENHOLME, G.E.W. & O'CONNOR, M., ed. — *Bacterial episodes and plasmids*. London, Churchill, 1969. p.213 — 226. [Ciba Foundation Symposium].
3. TRABULSI, L.R. & ZULIANI, M.E. — Estudos sobre a *E. coli* 0111:B4. III. Sensibilidade *in vitro* à sulfadiazina e a seis antibióticos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 11: 323-334, 1969.
4. ZULIANI, M.E. & TRABULSI, L.R. — Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e a cinco antibióticos de 166 amostras de *Shigella*, isoladas em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 10: 70-77, 1968.

Recebido para publicação em 26 de maio de 1972.

Endereço

Gilberti Moreno
Faculdade Ciências Médicas
e Biológicas de Botucatu
Caixa Postal, 102
18600 — Botucatu, S.P.

RESÍDUOS DE PESTICIDAS CLORADOS EM ÁGUAS (1)

CHLORINATED PESTICIDE RESIDUES IN WATER

WALKYRIA H. LARA (2)
HELOISA H.C. BARRETO (2)

SUMMARY

LARA, W.H. & BARRETO, H.H.C. — Chlorinated pesticide residues in water. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 69-74, 1972.

Chlorinated pesticide residues were determined by gas liquid chromatography with electron capture detector in 59 water samples received for chemical examination of potability at the Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil. The results indicate presence of BHC residues (alpha, beta and gama isomers) in all samples examined; DDT was found only in 3 samples and traces of aldrin in just one. The levels found indicate that contamination by these pesticides in waters of São Paulo, S.P., Brazil, is not very great at the present.

INTRODUÇÃO

A utilização de um número crescente de substâncias químicas altamente tóxicas, para combater as pragas e doenças na agricultura e na pecuária, melhorou e aumentou a produção de alimentos mas trouxe como consequência a contaminação dos mesmos, os quais, ingeridos pelo homem, podem causar perturbações em sua saúde. Dados sobre resíduos de pesticidas clorados são de grande importância, por serem estes compostos os mais persistentes, tanto na água como no solo, nas plantas e animais e também porque sua degradação origina metabolitos também tóxicos e persistentes. Com os compostos fosforados, bastante tóxicos, a decomposição é mais rápida e seus derivados não são tão tóxicos quanto eles.

A contaminação em águas pode ocorrer pela aplicação direta de pesticidas em superfícies de córregos e rios, como já se verificou por ocasião do combate às larvas de "borrachudos" (*simulideo*s) em regiões do litoral de São Paulo. Amostras colhidas a 500 metros do local de aplicação de BHC, após 14 dias, possuíam ainda um teor de lindana (isômero gama

BHC) de 0,07 mg/l (ALMEIDA²).

O carreamento, pelas águas de chuva, das partículas de solos tratados por pesticidas é a maior causa de contaminação dos córregos, rios e finalmente do mar. Os organismos aquáticos, peixes e crustáceos apresentam sempre resíduos de pesticidas clorados em níveis bem mais altos que os da água em que vivem, razão pela qual têm servido como verdadeiros "controles" em grande número de estudos de bacias hidrográficas, estuários de grandes rios e águas costeiras^{4,5,6,7,8,12,14,15}.

Antes mesmo que as águas de chuva atinjam as superfícies tratadas, elas já podem estar contaminadas pelas partículas carregadas pelos ventos. Análises realizadas na Inglaterra com amostras de água de chuva coletadas durante um ano em diversas regiões revelaram a presença de alfa BHC, Dieldrin, pp'DDT, p'DDE e pp'TDE em concentrações da ordem de parte por 10¹¹ e por 10¹² partes (TARRANT & TATTON¹⁶).

Nos lençóis aquáticos subterrâneos, é de se esperar uma contaminação bastante baixa, pois dificilmente os pesticidas aplicados ao

(1) Realizado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz.

Apresentado na 24^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, São Paulo, julho 1972.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

solo atingiriam os lençóis profundos, e os mais persistentes, como os clorados, são os que migram mais lentamente no solo¹¹.

Como parte da população de São Paulo ainda utiliza poços para seu abastecimento e afim de avaliar o grau de contaminação por pesticidas clorados, em águas da região, analisamos amostras de águas de poços, nascentes, de superfícies, e da rede de abastecimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinquenta e nove amostras colhidas por técnicos especializados da Seção de Águas do Instituto Adolfo Lutz, para exame químico de potabilidade, no município de São Paulo e regiões próximas, foram analisadas afim de se determinar resíduos de pesticidas clorados. Dentre elas, 23 amostras são de águas de poço, 13 de águas de nascentes, 11 de poços semi-artesianos, 9 de águas de superfícies (rios, represas, lagos) e 3 da rede de abastecimento.

O método empregado para análise consistiu de extração direta dos resíduos de pesticidas clorados, com solvente orgânico, seguido da concentração dos extratos em evaporador Kuderna-Danish e determinação por cromatografia gasosa com detector de captura eletrônica.

Extração — 500 ml da amostra foram extraídos em funil de separação, com torneira de teflon, com 4 porções sucessivas de éter de petróleo 30–60°C. Os extratos foram secados passando-os por uma coluna de sulfato de sódio anidro, granulado (aproximadamente 5 cm de altura e 2 cm de diâmetro) e concentrados em evaporador Kuderna-Danish até 5 ml. Retirado o tubo receptor, a evaporação foi completada sob corrente de nitrogênio e imediatamente dissolvido o resíduo com benzeno p.a. até o volume de 5 ml. Esta solução foi usada para a cromatografia a gás.

Os solventes e as condições de cromatografia seguiram as especificações descritas em "Determinação de resíduos de pesticidas organoclorados em alimentos"⁹ e em trabalhos anteriores^{1,10} que são iguais aos recomendados pelos métodos oficiais da A.O.A.C.³. Tratando-se de amostras de "águas potáveis", límpidas, não houve problemas de análise de sedi-

mento nem necessidade de "clean up".

A identificação dos picos dos cromatogramas foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões submetidos às mesmas condições de análise. Duas colunas, uma de QF₁ — DC 200 e outra de OV 225 foram usadas para confirmação dos resultados. A determinação quantitativa foi feita pelo método de comparação de áreas. Valores abaixo de 0,001 miligramas por litro (mg/l) foram considerados "traços" e 0,000, não aparecimento de pico no processo empregado.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Resíduos de BHC (isômeros alfa, beta e gama) foram encontrados em todas as amostras analisadas: alfa BHC em valores abaixo de 0,001 mg/l (traços) e beta mais gama BHC em valores oscilando em torno de 0,002 mg/l. A soma alfa mais beta mais gama BHC foi considerada como BHC total. Em três amostras foram encontrados resíduos de DDT e apenas uma apresentou traços de Aldrin.

Não há grande variação entre os valores encontrados.

Para o BHC total, as concentrações encontradas são da ordem de 0,002 mg/l, excluindo-se um valor esporadicamente alto de um poço semi-artesiano (0,014 mg/l).

A "Comissão Consultiva sobre o Uso de Padrões para Água Potável", do Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos, recomenda uma concentração de 0,056 mg/l como limite para Lindana e 0,042 mg/l para DDT (estas recomendações não estão ainda oficialmente adotadas)¹⁷.

Considerando o efeito cumulativo de tais resíduos em organismos e que os processos de tratamento de águas para abastecimentos não são efetivos na remoção de resíduos de pesticidas na ordem de grandeza em que são encontrados¹³, é necessário manter um controle contínuo dos níveis de resíduos apresentados pelas águas de abastecimento da população, embora os resultados encontrados até o presente não sejam altos.

Os quadros I, II, III, IV e V resumem os resultados obtidos e indicam a procedência das amostras, especificando quando possível sua localização.

QUADRO I

Resíduos de pesticidas clorados em águas de nascentes

Nº	Procedência	Exame Químico Potabilidade	BHC total mg/l	DDT mg/l
1	Suzano	potável	0,001	0,000
2	São Roque	potável	0,002	0,000
3	São Paulo	potável	0,003	0,000
4	Sta. Branca	potável	0,002	0,000
5	Apiai	potável	0,001	0,000
6	Sta. Branca	potável	0,002	0,000
7	São Paulo	potável	0,002	0,000
8	Itaquera	potável	0,001	0,000
9	Rio Claro	potável	0,002	0,000
10	Votorantim	potável	0,001	0,000
11	Embu	não potável	0,003	0,000
12	São Paulo	não potável	0,001	0,000
13	Juquitiba	não potável	0,002	0,000

0,000 = Não aparecimento de pico no cromatograma

QUADRO II

Resíduos de pesticidas clorados em águas de poços semi-artezianos

N.º	Procedência	Exame Químico Potabilidade	BHC total mg/l	DDT mg/l
1	Jaçanã	potável	0,002	0,000
2	Diadema	potável	0,001	0,000
3	Mauá	potável	0,002	0,000
4	Mauá	potável	0,001	0,000
5	Ipiranga	potável	0,014	0,012
6	Cotia	potável	0,004	0,000
7	Vila Maria	não potável	0,002	0,000
8	Vila Maria	potável	0,004	0,000
9	Centro S.P.	potável	0,005	0,001
10	S. Bernardo	não potável	0,003	0,000
11	S. Bernardo	potável	0,003	0,000

0,000 = Não aparecimento de pico no cromatograma

QUADRO III

Resíduos de pesticidas clorados em águas de poços

N.º	Procedência	Exame Químico Potabilidade	BHC total mg/l	DDT mg/l
1	São Miguel	potável	0,003	0,000 *
2	Pedreira	potável	0,004	0,001
3	Sta. Cecília	potável	0,001	0,000
4	Jacareí	não potável	0,002	0,000
5	Aeroporto	potável	0,003	0,000
6	Diadema	potável	0,002	0,000
7	Itapeirica	potável	0,005	0,000
8	Jardim Humaitá	não potável	0,005	0,000
9	Jabaquara	não potável	0,001	0,000
10	Amparo	—	0,001	0,000
11	Amparo	—	0,001	0,000
12	Amparo	—	0,001	0,000
13	São Paulo	não potável	0,001	0,000
14	São Paulo	potável	0,001	0,000
15	São Paulo	não potável	0,005	0,000
16	Sto. Amaro	não potável	0,001	0,000
17	Diadema	potável	0,003	0,000
18	Itaberaba	potável	0,002	0,000
19	São Paulo	—	Tr	0,000
20	São Miguel Paulista	potável	0,001	0,000
21	São Paulo	não potável	0,002	0,000
22	Juquitiba	não potável	0,002	0,002
23	São Paulo	potável	0,002	0,000

* = Amostra com traços de Aldrin
 0,000 = Não aparecimento de pico no cromatograma
 Tr = Traços — valores abaixo de 0,001 mg/l

QUADRO IV

Resíduos de pesticidas clorados em águas de superfície

Nº	Procedência	Exame Químico Potabilidade	BHC total mg/l	DDT mg/l
1	Itapetininga (Rio)	potável	0,002	0,000
2	Itapetininga (Rio)	potável	0,002	0,000
3	Apiá (Córrego)	potável	Tr	0,000
4	Interlagos (Lagoa)	não potável	Tr	0,000
5	Atibaia (Represa)	não potável	0,002	0,000
6	Santos (Piscina)	potável	0,001	0,000
7	Piracicaba (Represa)	não potável	0,001	0,000
8	São Paulo (Lagoa)	não potável	0,002	0,000
9	Pirituba (Córrego)	não potável	0,004	0,000

0,000 = Não aparecimento de pico no cromatograma
 Tr = Traços — valores abaixo de 0,001 mg/l

QUADRO V

Resíduos de pesticidas clorados em águas tratadas

Nº	Procedência	Exame Químico Potabilidade	BHC total mg/l	DDT mg/l
1	S.A.E.C.	Potável	Tr	0,000
2	S.A.E.C.	Potável	0,001	0,000
3	S.A.E.C.	Potável	0,001	0,000

S.A.E.C. = Superintendência de Águas e Esgotos da Capital

0,000 = Não aparecimento de pico no cromatograma

Tr = Traços – valores abaixo de 0,001 mg/l

É difícil uma comparação desses valores com os registrados na literatura, pois as referências disponíveis dizem respeito a Lindana (isômero gama BHC puro), enquanto que o BHC é produto técnico constituído por uma mistura de isômeros, variando de 12 a 30% de isômero gama (único isômero com propriedades inseticidas). De outro lado, os dados são de países onde os pesticidas clorados de maior emprego são o DDT e Lindana.

Agradecimentos

Agradecemos a colaboração do Dr. Mario Campos e auxiliares da Seção de Águas do Instituto Adolfo Lutz, pelas amostras que nos forneceram.

RESUMO

LARA, W.H. & BARRETO, H.H.C. – Resíduos de pesticidas clorados em águas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 69-74, 1972.

Os resíduos de pesticidas clorados foram determinados por processos de cromatografia a gás, com detector de captura eletrônica, em 59 amostras de águas de nascentes de poços de superfície, e de algumas tratadas para abastecimento. Os isômeros alfa, beta e gama BHC foram encontrados em todas as

amostras; DDT, em três, e traços de Aldrin, em apenas uma. Os níveis de BHC total (soma dos isômeros) foram da ordem de 0,002 mg/l. Esses níveis mostram que a contaminação existente em águas, na região da capital de São Paulo, não é grande até o momento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, M.E.W. & BARRETO, H.H.C. – Resíduos de pesticidas clorados em leite, consumido em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31: 13–20, 1971.
2. ALMEIDA, W.F. – *Polluição ambiental por pesticidas*. São Paulo, 1972. p.6. [Mimiogr.].
Aula proferida durante o Curso de Toxicologia de Defensivos Agrícolas, Instituto Biológico, São Paulo, 3 de abril de 1972.
3. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 11th ed. Washington, D.C., A.O.A.C., 1970.
4. BARTHEL, W.F.; HAWTHORN, J.C.; FORD, J.H.; BOLTON, G.C.; McDOWELL, L.L.; GRISSINGER, E.H. & PARSONS, D.A. – Pesticides residues in sediments of the lower Mississippi river and its tributaries. *Pestic. Monit. J.*, 3: 8–66, 1969.
5. BROWN, E. & NISHIOKA, Y.A. – Pesticides in selected western streams. A contribution to the National Program. *Pestic. Monit. J.*, 1: 38–46, 1967.

6. CASPER, V.L.; HAMMERSTROM, R.J.; ROBERTSON Jr, E.A.; BUGG Jr, J.C. & GAINES, J.L. – *Study of chlorinated pesticides in oysters and estuarine environment of the Mobile Bay area*. U. S. Dept. Health, Education and Welfare, Public Health Service, Bureau of Water and Hygiene, Cincinnati, Ohio, 1969, 47p.
7. COHEN, J.M.; PICKERING, Q.H.; WOODWARD, R.L. & VAN HEUVELEN, W. – Effecto of the fish poisons on water supplies. Part 3. Field study at Dickinson. *J. Am. Wat. Wks Ass.*, 53: 233-246, 1961.
8. HAMMERSTON, R.J.; RUSSEL, R.T; TYO, R.M.; ROBERTSON Jr., E.A.; GAINES, J.L. & BUGG Jr., J.C. – *Study of pesticides in shelfish and estuarine areas of Louisiana*. U.S. Dept. Health, Education and Welfare, Public Health Service, Cincinnati, Ohio, 1967. 26p.
9. INSTITUTO ADOLFO LUTZ – Determinação de resíduos de pesticidas organoclorados em alimentos. Definições e considerações gerais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31: 125-132, 1971.
10. LARA, W.H.; BARRETO, H.H.C. & TAKAHASHI, M.Y. – Resíduos de pesticidas clorados em conservas de carne bovina. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31: 63-70, 1971.
11. LICHTENSTEIN, E.P. – Movement of insecticides in soils under leaching and non leaching conditions. *J. Econ. Ent.*, 51: 380-383, 1958.
12. MODIN, J.C. – Chlorinated hydrocarbon pesticides in California bays and estuaries. *Pestic. Monit. J.*, 3: 1-7, 1967.
13. NICHOLSON, H.P.; GRZENDA, A.R.; LAVER, G.J.; COX, W.S.; & TEASLEY, J.I. – Water pollution by insecticides in an agricultural river basin. 1. Occurrence of insecticides in river and treated municipal water. *Limnol. Oceanogr.*, 9: 310-317, 1964.
14. SMITH, G.E. & ISOM, B.G. – Investigation of effects of large-scale applications of 2,4-D on aquatic fauna and water quality. *Pestic. Monit. J.*, 1: 16-21, 1967.
15. SPARR, B.I.; APPLEBY, W.G.; DeVRIES, D.M.; OSMUN, J.V.; McBRIDE, J.M. & FOSTER, G.L. – Insecticide residues in water ways from agricultural use. In GOUND, R.F., ed – *Organic pesticides in the environment*. Washington, D.C., American Chemical Society, 1966. p.146-162.
16. TARRANT, K.R. & TATTON, J. O.G. – Organochlorine pesticides in rainwater in the British Isles. *Nature* (London), 219: 725-727, 1968.
17. REPORT. Commission on pesticide and their relationship to environmental health. Washington, D.C., 1969. Part I & II, p. 122.

Recebido para publicação em 30 de maio de 1972.

SOBRE A FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE ENTEROBACTÉRIAS PATOGÊNICAS
NAS FEZES DE CRIANÇAS DE RIBEIRÃO PRETO, SÃO PAULO (1)

STUDY OF FREQUENCY OF PATHOGENIC ENTEROBACTERIA IN CHILDREN UNDER
FIVE YEARS OLD IN RIBEIRÃO PRETO, SÃO PAULO, BRAZIL

IVAN PRADO DA CUNHA (2)
MITUCA KAKU (2)
IZABEL YOKO ITO (3)
OCTÁVIO BARACCHINI (3)

SUMMARY

CUNHA, I. P.; KAKU, M.; ITO, I. Y. & BARACCHINI, O. — Study of frequency of pathogenic enterobacteria in children under five years old in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 75-77, 1972.

The frequency of the isolation of enterobacteria among 100 children under 5 years of age, with diagnosis of gastroenteritis, in Ribeirão Preto, S.P., Brazil, had been studied. It had been confirmed the data of L.C. Raya *et alii* (1967) and C. Solé-Vernin *et alii* (1968) on the low incidence of *Salmonella* in the same area.

INTRODUÇÃO

Enterobactérias patogênicas têm sido isoladas de adultos e crianças em várias regiões do Estado de São Paulo (TAUNAY & SOLÉ-VERNIN⁷; TAUNAY *et alii*⁸; MANISSA-DJIAN *et alii*²; SERRANO & TRABULSI⁵; TAUNAY⁹; FALCÃO¹; MONTELLI *et alii*³).

Trabalhos realizados em Ribeirão Preto (RAYA *et alii*⁴ e SOLÉ-VERNIN *et alii*⁶) mostram, no entanto, baixa incidência com relação ao gênero *Salmonella*.

A presente investigação, realizada com material de doentes selecionados quanto ao quadro clínico, visa também verificar se nesses

casos a incidência de *Salmonella* entre nós é diferente da encontrada em outras regiões.

MATERIAL E MÉTODOS

As fezes foram colhidas em recipientes esterilizados e enviadas ao laboratório com a devida informação clínica.

Este trabalho foi realizado em duas etapas, obedecendo à mesma metodologia.

1ª etapa

50 amostras procedentes de instituição hospitalar infantil, no período de dezembro de 1967 a março de 1968.

2ª etapa

15 amostras procedentes de instituição hospitalar infantil, 10 amostras de pronto

(1). Realizado no Laboratório I de Ribeirão Preto, S.P., do Instituto Adolfo Lutz.

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

(3) Do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto, S.P.

socorro infantil e 25 amostras procedentes de clínica pediátrica infantil particular, no período de fevereiro de 1968 a junho de 1969.

As fezes foram semeadas de acordo com o seguinte esquema: diretamente em meio de SS ágar (1) e de MacConkey ágar (1) e em meio de selenito F(1) e de Kauffmann (Taunay⁹) para o enriquecimento. Após incubação de 24 a 120 horas em estufa a 37°C, o crescimento dos meios de enriquecimento foi passado para placas de SS ágar e de Kristensen (Taunay⁹).

De cada placa, semeada diretamente ou após enriquecimento, colheu-se em média 10 colônias fermentadoras ou não da lactose que foram passadas em meio de T.S.I. ágar (2) modificado. O crescimento dos tubos (T.S.I.) que apresentaram o comportamento indicativo de enterobactérias suspeitas de pertencerem aos gêneros *Shigella* e *Salmonella* foi estudado quanto ao comportamento bioquímico e sorológico.

O crescimento nos tubos de T.S.I. que apresentaram o comportamento de *E. coli* foi submetido a testes sorológicos específicos, para o grupo G.E.I.

A identificação bioquímica foi efetuada observando a ação em diversos substratos, como a seguir: glicose, lactose, sacarose, maltose, manitol, glicerol, malonato de sódio, citrato de sódio, uréia, KCN, lisina, fenil-alanina, ornitina e água peptonada.

Os soros aglutinantes de grupo e específicos foram fornecidos pelo Laboratório Central do Instituto Adolfo Lutz.

RESULTADOS

Os resultados estão expostos nos quadros I, II, III e IV.

QUADRO I

Frequência de isolamento de enterobactérias dos gêneros *Shigella*, *Salmonella* e *Escherichia*, grupo G.E.I. em 100 amostras examinadas

Enterobactérias isoladas	1ª etapa (50 casos)		2ª etapa (50 casos)		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Escherichia</i> G.E.I.	6	12	9	18	15	15
<i>Shigella</i>	2	4	2	4	4	4
<i>Salmonella</i>	0	0	0	0	0	0
Total	8	16	11	22	19	19

QUADRO II

Sub-grupos do gênero *Shigella* isolada em 100 amostras

Sub-grupo de <i>Shigella</i>	Nº
<i>Shigella sonnei</i>	1
<i>Shigella flexneri</i>	1
<i>Shigella ambigua</i>	1
<i>Shigella alkalescens</i>	1
Total	4

QUADRO III

Grupo sorológico de *Escherichia coli*, do grupo G.E.I.

Grupo sorológico	Nº	%
Grupo I	1	1
Grupo II	6	6
Grupo III	8	8
Total	15	15

QUADRO IV

Incidência de *Shigella* e *E. coli* G.E.I. em fezes de diferentes procedências

Procedência	Fezes Nº	<i>E. coli</i>		<i>Shigella</i>		Totais	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
IHI (1)	65	7	10,76	2	3,07	9	13,83
PSI (2)	10	1	10,00	1	10,00	2	20,00
CPIP (3)	25	7	28,00	1	4,00	8	32,00

(1) - Instituição hospitalar infantil.

(2) - Pronto socorro infantil.

(3) - Clínica pediátrica infantil particular.

(1) Oxoid

(2) Difco — Para 100ml do meio esterilizado adicionar 1,6ml de uma solução estéril de uréia a 50% e distribuir assepticamente. Autoclavar a vapor fluente por 30 minutos.

COMENTÁRIOS

Como mostra o quadro I, a freqüência de isolamento de *E. coli* (G.E.I.) foi de 15%. Este resultado é concordante com resultados de outros autores em outras regiões do Estado de São Paulo (Taunay⁹; Manissadjian *et alii*; Serrano & Trabulsi). Em Ribeirão Preto, Solé-Vernin *et alii* encontraram 7,05%, e Raya *et alii*, 56,0%, em um surto de gastroenterocolite entre prematuros no berçário do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

Quanto ao gênero *Shigella*, os nossos achados são concordantes com os de anos anteriores encontrados em Ribeirão Preto (Raya *et alii* e Solé-Vernin *et alii*). São, porém, baixos, quando comparados com os de Taunay *et alii*⁸; Serrano & Trabulsi, e Falcão.

No tocante ao gênero *Salmonella*, a diferença é bastante grande; Raya *et alii* não conseguiram isolar nenhuma vez e Solé-Vernin *et alii*, apenas uma vez, em 2 935 amostras de fezes examinadas. Na presente investigação também não conseguimos isolar salmonelas

Os quadros II e III mostram, respectivamente, os sub-grupos de *Shigella* e os grupos sorológicos de *E. coli* G.E.I.

O quadro IV mostra-nos um resultado curioso. Um maior índice de isolamento dos gêneros *Shigella* e *Escherichia* (G.E.I.), 32%, foi obtido de fezes de uma classe de pacientes mais favorecida economicamente.

RESUMO

CUNHA, I. P.; KAKU, M.; ITO, I. Y. & BARACCHINI, O. — Sobre a freqüência de isolamento de enterobactérias patogênicas nas fezes de crianças de Ribeirão Preto, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 75-77, 1972.

Um estudo sobre a freqüência de isolamento de enterobactérias patogênicas em crianças de menos de 5 anos, na cidade de Ribeirão Preto, S.P., Brasil, é apresentado.

Os autores, embora trabalhando com material proveniente de casos com diagnóstico clínico de gastroenterite, confirmam os dados de L.C.Raya *et alii* (1967) e C. Solé-Vernin *et alii* (1968), quanto à baixa incidência de *Salmonella* na mesma área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FALCÃO, D.P. — *Investigação sobre a presença de Salmonella em Araraquara (S.P.) com referência especial aos processos de isolamento*, Araraquara, 1969. [Tese — Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara].
2. MANISSADJIAN, A.; PENNA, H.A.O.; BARBIERI, D. & TRABULSI, L.R. — Incidência de enterobacteriaceas aeróbias patogênicas em berçário aberto. *Rev. Paul. Med.*, 66: 63-67, 1965.
3. MONTELLI, A. C.; CAMPOS, C.E.O.P.; AOKI, D.S. & DEARLIS, R. — Estudo de *Salmonellas* isoladas na Faculdade de Ciências Biológicas de Botucatu (S.P.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 29, São Paulo, 1970. Resumo de trabalhos.
4. RAYA, L.C.; SOLÉ-VERNIN, C. & MOLINARI, A.S. — Verificação de *Escherichia coli* 0111:B4 em surto de gastroenterocolite entre prematuros no berçário do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. *Hospital (Rio de Janeiro)*, 72(4): 1175-1187, 1967.
5. SERRANO, J.A. & TRABULSI, L.R. — Observações sobre a freqüência de isolamento de *Shigella*, *Salmonella* e *E. coli* enteropatogênica, das fezes de crianças com diarreia aguda, na cidade de São Paulo. *Arq. Gastroent.* 3(4): 221-225, 1966.
6. SOLÉ-VERNIN, C.; BARACCHINI, O.; COSTA, A. & ITO, I.Y. — Nota sobre a família *Enterobacteriaceae* em Ribeirão Preto, SP. *Hospital (Rio de Janeiro)*, 74(1): 229-234, 1968.
7. TAUNAY, A.E. & SOLÉ-VERNIN, C. — Sobre a ocorrência de bactérias dos gêneros *Shigella* e *Salmonella* em Araraquara, São Paulo. *Hospital (Rio de Janeiro)*, 41(1): 25-72, 1952.
8. TAUNAY, A.E.; MARTINS, H.; TOPOROWSKI, J.; TOLEDO, L.A. & PEIXOTO, E.S. — Investigações laboratoriais sobre a enterite infantil por *E. coli* G.E.I. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 18: 45-81, 1958.
9. TAUNAY, A. — *Diagnóstico bacteriológico das salmonelas de origem animal, sua importância e freqüência no município de São Paulo*. São José dos Campos, 1967. [Tese — Faculdade de Odontologia de São José dos Campos].

Recebido para publicação em 30 de maio de 1972.

MÉTODO DE DOSAGEM TURBIDIMÉTRICA DE PEQUENAS QUANTIDADES DE DDT
E DE BHC, APÓS SUA SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA
EM CAMADA DELGADA⁽¹⁾

TURBIDIMETRIC METHOD FOR THE DOSAGE OF SMALL QUANTITIES OF DDT AND
BHC AFTER THEIR SEPARATION AND IDENTIFICATION THROUGH THE THIN-LAYER
CHROMATOGRAPHY PROCESS

PAULO DE ALMEIDA VIDAL ⁽²⁾
ALMIR JOSÉ RICCIARDI ⁽²⁾

SUMMARY

VIDAL, P.A. & RICCIARDI, A.J. — Turbidimetric method for the dosage of small quantities, of DDT and BHC after their separation and identification through the thin-layer chromatography process. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 79-82, 1972.

A method for the separation and identification of small amounts of DDT and BHC through the thin layer chromatography in silica gel is presented. The diphenylamine was used as a chromogenic reagent with exposition to ultraviolet light. The two pesticides, after the development have been eluted from the chromatoplates and hydrolysed with potassium hydroxide; the chloride ion resulting was precipitated by silver nitrate and determined by turbidimetry. It was verified that there was a linear variation of the absorption in function of the amounts of the pesticides, in the order of a milligram tenths amounts.

INTRODUÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi a separação e identificação do DDT e do BHC, quando em mistura, e a dosagem destes dois pesticidas, após sua separação e identificação.

Para essa separação e identificação, foi empregada a cromatografia em camada delgada, que permitiu ainda a separação dos principais isômeros do DDT e do BHC, uma vez que o hexano, usado como solvente de arrastamento, forneceu R_F diferentes para aqueles isômeros.

Como reagente cromogênico foi empregada apenas a difenilamina, preconizada por ADAMOVIĆ^{1,2}, que permitiu não só a revelação das manchas, como também a diferenciação entre o DDT e o BHC, por causa dos aspectos diferentes que aquelas manchas apresentaram quando reveladas à luz U.V. e das

colorações diferentes apresentadas à luz natural, depois da exposição à luz U.V.

As manchas reveladas foram retiradas das cromatoplasmas e, após hidrólise pelo hidróxido de potássio, pelo método de ALMEIDA, PIEDADE & SOUZA³, modificado, o cloro hidrolisado foi precipitado como cloreto de prata e dosado turbidimetricamente pela técnica apresentada por PRADO, LARINI, CARVALHO & SILVA⁴, verificando-se que a difenilamina não interferiu nesta dosagem.

MATERIAL E MÉTODOS

1. *Separação e identificação do DDT e do BHC por cromatografia em camada delgada*

a) *Material*

Cromatoplasmas de sílica gel G ⁽³⁾, segundo Stahl, de 6 cm de largura por 16 cm de altura,

(1) Trabalho realizado no Laboratório I de Ribeirão Preto, do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Laboratório I de Ribeirão Preto, S.P.

(3) Merck.

preparadas misturando-se a sílica gel com água, na proporção de 1 g de sílica gel para 2 ml de água, aplicando-se sobre lâmina de vidro, deixando-se secar em temperatura ambiente durante 24 horas, obtendo-se camadas de 0,25 mm de espessura.

Lâmpadas de luz U.V.⁽¹⁾

Pipeta graduada de 2 ml

Tubos capilares

Nebulizador

Secador de ar quente

Soluções padrões de DDT e BHC: soluções a 0,1% p/v em benzeno, purificadas por recristalização em benzeno.

Solvente de arrastamento: Hexano⁽²⁾, com ponto de ebulição entre 60 e 80°C.

Reativo cromogênico: Solução de difenilamina a 1% p/v em acetona.

b) Método

Em pipeta graduada de 2 ml, foram medidos 0,4 – 0,8 – 1,2 – 1,6 – 2,0 ml da mistura em partes iguais das soluções padrões dos dois pesticidas, correspondendo respectivamente a 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 – 1,0 mg de cada pesticida.

Estes volumes foram concentrados em corrente de ar quente e as amostras foram aplicadas em cinco placas, por meio de tubos capilares, num ponto a 2 cm da borda inferior de cada placa.

Os cromatogramas foram desenvolvidos empregando-se o hexano como solvente de arrastamento, em temperatura ambiente de 25°C, até a linha de frente atingir a altura de 10 cm a partir do ponto de aplicação das amostras.

Paralelamente foi desenvolvido um cromatograma, em que foi aplicada uma amostra de solução de cloreto de sódio, para verificação de migração do íon cloreto.

As placas, depois de secas ao ar, foram nebulizadas com a solução de difenilamina e, em seguida, expostas à luz U.V., durante 10 minutos, para revelação e, posteriormente, observadas à luz branca e determinados os R_F.

2. Dosagem turbidimétrica do DDT e do BHC, separados por cromatografia em camada delgada

a) Material

Balões de fundo redondo, de 50 ml, munidos de condensadores de refluxo, com juntas esmeriladas

Banho-maria fervente

Balões volumétricos de 50 ml

Tubos de ensaio

Pipetas graduadas de 5 ml

Pipetas volumétricas de 10 ml

Pipeta volumétrica de 20 ml

Funis de vidro

Papel-filtro

Espectrofotômetro (3)

Etanol, isento de aldeídos

Solução alcoólica de hidróxido

de potássio 0,1 N

Solução alcoólica de fenolftaleína a 1% p/v

Solução de ácido nítrico 3 N

Solução de nitrato de prata a 3% p/v

b) Método:

As manchas de DDT e BHC obtidas foram raspadas separadamente das cromatoplasmas e transferidas para balões de 50 ml, com o auxílio de 10 ml de etanol. Foram adicionados 10 ml de solução alcoólica de hidróxido de potássio 0,1 N e os balões foram colocados em banho-maria, mantendo-se em ebulição com refluxo, durante 5 minutos.

Os balões foram resfriados em água corrente e o seu conteúdo foi transferido para balões volumétricos de 50 ml, com o auxílio de 20 ml de etanol. A cada balão foi adicionada uma gota de solução alcoólica de fenolftaleína a 1% p/v e foi feita a neutralização com solução de ácido nítrico 3 N.

O volume foi completado com água. O conteúdo dos balões foi filtrado e, a 10 ml de cada filtrado, colocado em tubo de ensaio, foi

(1) Philips HPW 125W, 57236E/70

(2) British Drug House

(3) Coleman Junior

adicionado 1 ml de solução de ácido nítrico 3 N e 1 ml de solução de nitrato de potássio a 3% p/v.

Os tubos foram invertidos uma vez e deixados em repouso na obscuridade, durante 30 minutos.

Paralelamente foi preparada uma prova em branco, com as mesmas operações realizadas para as manchas dos pesticidas, desde a raspagem da sílica gel da cromatoplaça.

A turbidez desenvolvida foi lida no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 415 m μ .

RESULTADOS

1. Separação

A exposição à luz U.V. dos cromatogramas desenvolvidos, após a nebulização com a difenilamina, permitiu verificar não só a separação entre o DDT e o BHC, como ainda a diferenciação entre os dois pesticidas, quanto ao aspecto das manchas, pois à luz U.V., o DDT apresentou fluorescência amarelo-esverdeada sobre o fundo violeta da placa, enquanto que o BHC apresentou manchas violetas, porém bem mais escuras que o fundo da placa. Além disso, foram observadas, quanto ao DDT, duas manchas correspondentes aos seus dois principais isômeros, e quanto ao BHC, quatro manchas correspondentes aos seus quatro principais isômeros.

Após a exposição dos cromatogramas à luz U.V., eles foram observados à luz branca, apresentando-se as duas manchas correspondentes ao DDT com a coloração amarelo-esverdeada, com R_F iguais a 0,71 e 0,81, enquanto que as quatro manchas correspondentes ao BHC apresentaram coloração cinza com R_F iguais a 0,18; 0,28; 0,44 e 0,60, sobre o fundo da placa (Fig. 1).

A placa em que foi aplicada a amostra de solução de cloreto de sódio apresentou, após a nebulização com a solução de difenilamina e exposição à luz U.V., uma mancha violeta fluorescente com $R_F = 0,00$, sem coloração à luz branca.

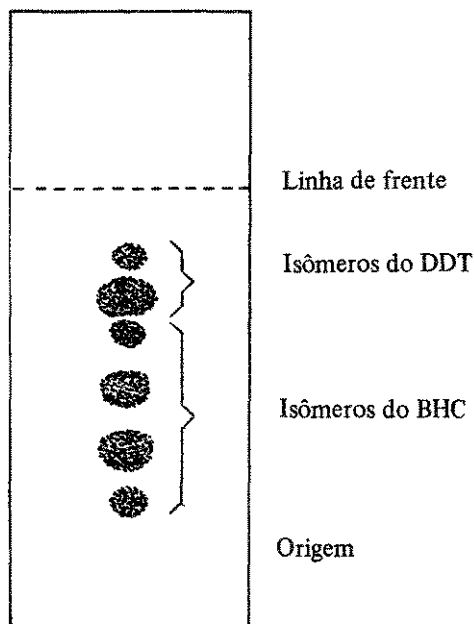


Fig. 1 – Cromatograma em camada delgada de sílica gel de misturas de BHC e DDT, reveladas por nebulização com solução acetônica de difenilamina e exposição à luz U.V.

2. Dosagens

Os resultados obtidos são apresentados no quadro abaixo, correspondendo o zero do aparelho à prova em branco.

Análise turbidimétrica do cloro hidrolisável de amostras de DDT e BHC

Quantidade da amostra mg	Densidade óptica X 100	
	DDT	BHC
0,20	1,0	2,0
0,40	2,0	5,0
0,60	2,8	7,0
0,80	4,2	10,0
1,00	4,6	11,0

Com estes dados, foi construído o gráfico apresentado na Fig. 2:

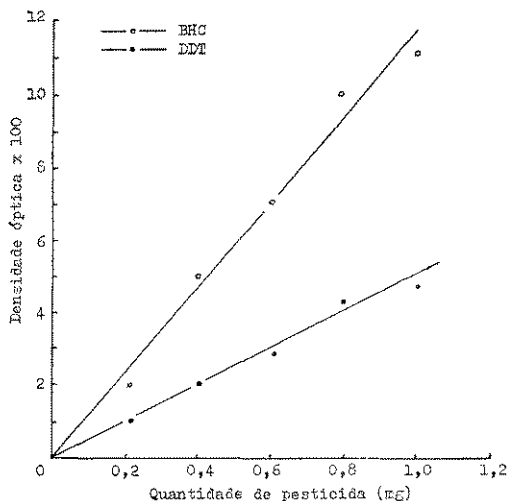


Fig. 2 — Curvas da análise turbidimétrica do cloro hidrolisável de amostras de BHC e DDT.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A técnica descrita constitui um método simples para a separação e identificação do BHC e do DDT quando misturados, bem como para a determinação quantitativa desses dois pesticidas.

Como por esse procedimento pode ser feita a dosagem de DDT e BHC, em quantidades da ordem de décimos de miligrama, há a possibilidade de sua aplicação no doseamento de resíduos desses pesticidas em produtos alimentícios.

RESUMO

VIDAL, P.A. & RICCIARDI, A.J. — Método de dosagem turbidimétrica de pequenas quantidades de DDT e de BHC, após sua separação e identificação por cromatografia em camada delgada. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 79-82, 1972.

É apresentado um método para a separação e identificação de pequenas quantidades de DDT e BHC, por cromatografia em camada

delgada em sílica gel, empregando-se como reagente cromogênico a difenilamina, com exposição à luz ultravioleta. Os dois pesticidas, após a revelação, foram eluídos das cromatoplasmas e hidrolisados por hidróxido de potássio; o íon cloreto formado foi precipitado por nitrato de prata e dosado turbidimetricamente. Verificou-se haver variação linear da absorção em função das quantidades dos pesticidas, da ordem de décimos de miligrama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMOVIĆ, V.M. — Aromatic amines as spray reagents in the thin-layer chromatography of chlorinated organic pesticides. *J. Chromat.*, 23: 274-279, 1966.
2. ADAMOVIĆ, V.M. apud PETIT, D. — Utilization de la diphénylamine en combinaison avec l'acide chlorhydrique comme agent général de révélation des pesticides. *Revue Ferment. Ind. Aliment.*, 25: 190-195, 1970.
3. ALMEIDA, N.F.; PIEDADE, J.R. & SOUZA, D. — *Química dos pesticidas*. São Paulo, Fundo de Pesquisas do Instituto Biológico de São Paulo, 1962.
4. PRADO, A.B.; LARINI, L.; CARVALHO, D. & SILVA, H.C. — Método turbidimétrico para a determinação de inseticidas clorados. *Cienc. Cult. (Supl.)*, 23: 43, 1971. Resumo.

Recebido para publicação em 16 de junho de 1972.

CONSIDERAÇÕES SOBRE NOVO SURTO EPIDÊMICO DE LEPTOSPIROSES
NA CIDADE DO RECIFE EM 1970⁽¹⁾

CONSIDERATIONS ON A NEW OUTBREAK OF LEPTOSPIROSIS IN THE CITY
OF RECIFE, PERNAMBUCO, BRAZIL, IN 1970

MARCELO OSWALDO ÁLVARES CORRÊA⁽²⁾
SABURO HYAKUTAKE⁽²⁾
RINALDO DE AZEVEDO⁽³⁾

SUMMARY

CORRÊA, M.O.A.; HYAKUTAKE, S. & AZEVEDO, R. — Considerations on a new outbreak of leptospirosis in the city of Recife, Pernambuco, Brazil, in 1970. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 83-87, 1972.

A new outbreak of leptospirosis which occurred in 1970 among the population of Recife, after severe floods, was studied. Ninety nine out of 102 cases registered were confirmed by sero-agglutination test, one by necropsy and 2 by hemoculture.

The predominant causal agent was *Leptospira icterohaemorrhagiae* (88 cases), followed by *L. canicola* (6 cases) and *L. grippityphosa* (5 cases).

One strain of *L. grippityphosa* was isolated by hemoculture, for first time in Brazil.

INTRODUÇÃO

Em meados de 1966, em consequência de duas enchentes sucessivas que assolaram a cidade do Recife, ocorreu intenso surto epidêmico de leptospirose entre a população conforme descreveram AZEVEDO & CORRÊA¹ quando registraram 181 casos, dos quais 180 comprovados através da soro-aglutinação, e um pela necropsia.

Na referida publicação, aqueles autores estudaram aspectos epidemiológicos, laboratoriais e clínicos da epidemia de leptospirose.

A leptospira dominante foi a *L. icterohaemorrhagiae*, responsável por 170 casos; as demais foram a *L. australis* com 5 casos, a *L. pomona* com 3 casos e a *L. andamana* com 2 casos. A mortalidade foi de 3,3%.

MAGALHÃES & VERAS² em 1970, visando determinar a real extensão da zoonose no Recife e a identificação dos tipos prevalentes em condições endêmicas, examinaram, através da soro-aglutinação, 720 amostras de sangue de pacientes clinicamente suspeitos, encontrando 84 (11,7%) positivas das quais 44 (52,5%) o foram para *L. icterohaemorrhagiae*, 9 para *L. canicola* (10,7%), 2 para *L. ballum* (2,4%), 10 para *L. cynopteri* (11,9%), 5 para *L. australis* (5,9%), 5 para *L. pomona* (5,9%) e 9 para *L. panama* (10,7%).

Em 1970, após intensas precipitações pluviárias registradas de 19 a 21 de julho e principalmente, de 10 a 11 de agosto, ocorreram novas e extensas enchentes na cidade do Re-

(1) Realizado na Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz.

Apresentado ao 8.º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, realizado em Belo Horizonte, fevereiro, 1972.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

(3) Da Faculdade de Ciências Médicas de Pernambuco e da Faculdade de Medicina da Universidade do Recife.

cife, as quais, a exemplo do acontecido em 1966, condicionaram novo surto epidêmico de leptospiroses humanas, ainda uma vez diagnosticadas na Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. A divulgação de alguns dados sobre este surto epidêmico constitui o objetivo da presente publicação.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sangue vieram em sucessivas remessas por via aérea de Recife a São Paulo,

condicionadas em frascos com tampão de borracha.

As hemoculturas foram obtidas pela inoculação de sangue em tubos com meio de Fletcher, sendo a sementeira feita à cabeceira dos pacientes, num total de 56 hemoculturas.

A técnica de soro-aglutinação empregada foi a recomendada pelo Comitê de Peritos em Leptospirose da O.M.S.³, sendo o título mínimo diagnóstico o de 1:200. Como antígenos foram utilizadas as culturas vivas em meio de Korthoff modificado, sendo a seguinte a composição da bateria de antígenos:

QUADRO I

Soro-tipos utilizados como antígenos

Soro-grupo	Soro-tipo	Cepa de referência
1 — <i>Icterohaemorrhagiae</i>	icterohaemorrhagiae	RGA
	copenhageni	M20
2 — <i>Canicola</i>	canicola	Hond Utrecht IV
3 — <i>Pomona</i>	pomona	Pomona
4 — <i>Grippotyphosa</i>	grippotyphosa	Moskva V
5 — <i>Tarassovi</i>	tarassovi	Mitis Johnson
6 — <i>Hebdomadis</i>	hebdomadis	Hebdomadis
	wolffi	3705
	sejroe	M84
	saxkoebing	Mus 24
7 — <i>Australis</i>	australis	Ballico
8 — <i>Bataviae</i>	bataviae	Swart
9 — <i>Ballum</i>	castellonis	Castellón 3
10 — <i>Panama</i>	panama	CZ 214 K
11 — <i>Pyrogenes</i>	pyrogenes	Salinem
12 — <i>Javanica</i>	javanica	Veldrat Batavia 46
13 — <i>Autumnalis</i>	autumnalis	Akiyami A
	djasiman	Djasiman
	sentot	Sentot
14 — <i>Cynopteri</i>	cynopteri	3522 C
15 — <i>Semarang</i>	patoc	Patoc I
16 — <i>Andamana</i>	andamana	CH 11
17 — <i>Shermani</i>	shermani	LT 821

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as amostras de sangue correspondentes a 170 pacientes examinadas pelo processo de soro-aglutinação, 99 revelaram títulos diagnósticos que variaram de 1:200 a 1:102 400 para três diferentes sorotipos de leptospiroses, conforme se verifica na análise do quadro II.

Ainda uma vez, houve absoluto predomínio da *L. icterohaemorrhagiae*, agente etiológico

em 88 casos (88,8%) seguida pela *L. canicola* com 6 casos e pela *L. grippotyphosa* com 5 casos.

Não consideramos como positivos dois casos em que o título foi de 1:100 porque, em face de fatores inerentes à situação criada pelas enchentes, não foi possível obter dados clínicos e laboratoriais da maioria dos pacientes os quais foram distribuídos por diferentes hospitais do Recife.

QUADRO II

Quadro demonstrativo dos títulos máximos de soro-aglutininas obtidos

Títulos Sorotipo	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	Total de casos
	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	5	2	8	7	6	23	10 ⁽²⁾	11	15	
<i>L. canicola</i>	—	2	1	2	—	—	—	—	1	—	6
<i>L. grippotyphosa</i>	1	1 ⁽¹⁾	1	—	—	—	2	—	—	—	5
<i>Total</i>	6	5	10	9	6	23	12	11	16	1	99

(1) Coaglutinação ao mesmo título para *L. bataviae*

(2) Coaglutinação ao mesmo título para *L. canicola* (1 caso)

O paciente W.S.S., clinicamente suspeito, porém negativo sorologicamente, teve confirmação diagnóstica de leptospirose pela necropsia, totalizando assim 100 casos positivos para leptospirose aos quais acrescentaremos mais 2 confirmados exclusivamente pela hemocultura, eis que não foram enviadas amostras de sangue desses pacientes para execução das provas de aglutinação. É o que está exposto no quadro III, demonstrativo das hemoculturas positivas, em número de nove, das quais oito foram identificadas como *L. icterohaemorrhagiae* e uma como *L. grippotyphosa*.

Nestes termos, o total de casos de leptospiroses humanas ocorridas na epidemia conseqüente às enchentes de julho e agosto de 1970, atinge a cifra de 102 casos.

Desejamos ainda salientar que pela primeira vez foi isolada a *L. grippotyphosa* do homem,

através de hemocultura, em nosso país, eis que até então a *L. grippotyphosa* fora isolada apenas por Santa Rosa⁴ nos animais *Nectomys squamipes* e *Didelphis marsupialis*.

A primeira enchente teve início aos 21 dias de julho de 1970, após dois dias de intensas chuvas no interior do Estado, nas cabeceiras dos rios Beberibe e Capibaribe, que banham a cidade do Recife; o volume das águas e o seu tempo de permanência nas ruas alagadiças foram maiores do que em 1966. Até 10 de agosto contávamos com regular número de doentes; nesse dia choveu torrencialmente como se pode observar nos gráficos 1 e 2 em que estão representadas as alturas de chuva em milímetros e por hora na cidade do Recife nos dias 19, 20 e 21 de julho e 10 e 11 de agosto, atingindo as águas da inundação mais de um metro de altura.

QUADRO III

Quadro demonstrativo das hemoculturas positivas

Iniciais do paciente	Título máximo da soro-aglutinação	Leptospira isolada
I.L.S.	<i>L. grippotyphosa</i> 1:12.800	<i>L. grippotyphosa</i>
A.C.S.	<i>L. icterohaemorrhagiae</i> 1:1.600	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>
I.B.S.	<i>L. icterohaemorrhagiae</i> 1:12.800	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>
	<i>L. canicola</i> 1:12.800	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>
R.P.N.	<i>L. icterohaemorrhagiae</i> 1:51.200	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>
M.E.	<i>L. icterohaemorrhagiae</i> 1:51.200	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>
A.C.	<i>L. icterohaemorrhagiae</i> 1:200	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>
I.A.S.	<i>L. icterohaemorrhagiae</i> 1:800	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>
J.H.R.F.	—	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>
J.V.F.	—	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>

Gráfico 1

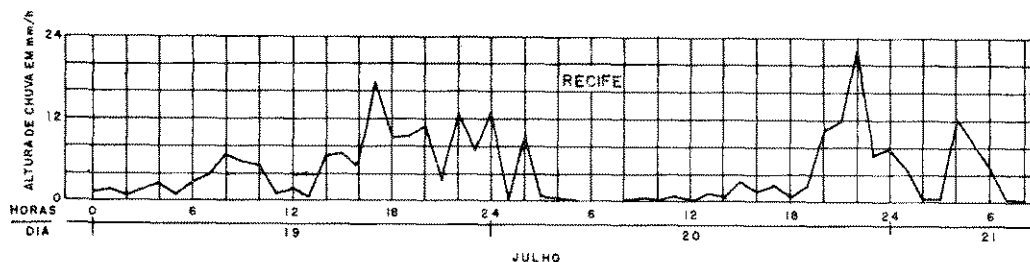
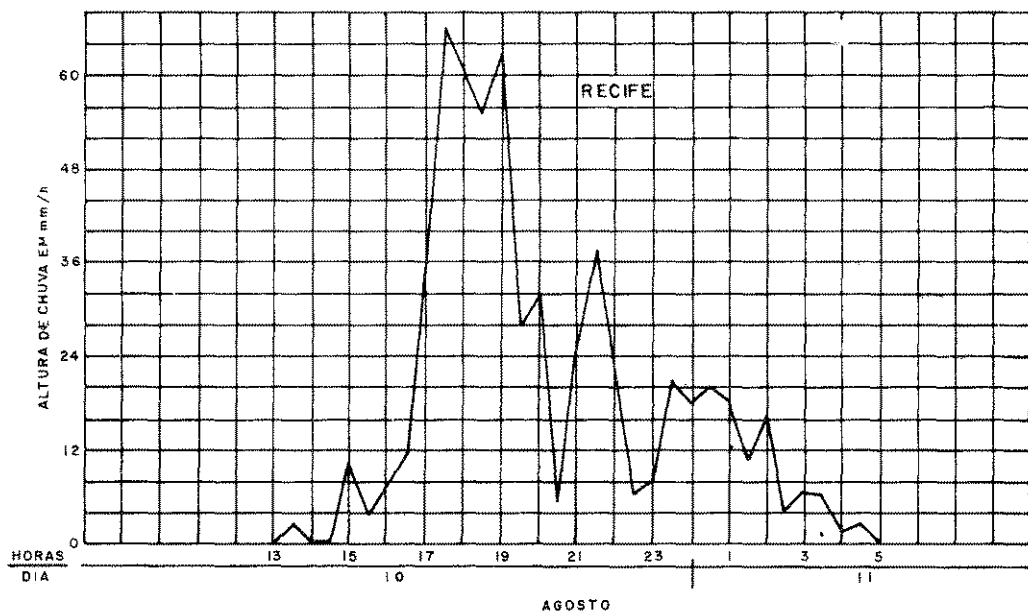


Gráfico 2



Então a enfermaria do Hospital "Oswaldo Cruz", onde estavam cerca de 20 doentes, foi invadida pelas águas que atingiram meio metro de altura, obrigando a remoção dos doentes para outro hospital. Compreende-se assim que

não nos foi possível seguir clínica e laboratorialmente a evolução da maioria dos pacientes. O paciente I.B.S. cuja sorogutinação foi positiva a 1:12.800 para *L.icterohaemorrhagiae* e *L.canicola*, faleceu de uremia e com fenôme-

nos hemorrágicos intensos assim como P.S.M. Com quadro de insuficiência cardíaca aguda, faleceu o paciente J.A.S. A paciente M.E.A., uma jovem que esteve por longo tempo em contacto com as águas da enchente e cujo quadro clínico era o de uma meningoencefalite, veio a se restabelecer após a terapêutica por penicilina intravenosa. O paciente C.H.M. foi um caso de extrema gravidade, tendo permanecido inconsciente durante 8 dias, com exantema e fenômenos hemorrágicos intensos, logrando todavia, restabelecer-se.

Registramos ao todo seis casos de morte dentre o total de 102 pacientes (5,8%) em que a infecção leptospirótica foi positivada, o que representa taxa maior do que a ocorrida em 1966, quando foi de 3,3%.

RESUMO

CORRÊA, M.O.A.; HYAKUTAKE, S. & AZEVEDO, R. — Considerações sobre novo surto epidêmico de leptospiroses na cidade do Recife em 1970. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 83-87, 1972.

Os autores apresentam breve relato do novo surto epidêmico de leptospiroses ocorrido em 1970 entre a população do Recife, conseqüente às enchentes que em julho e agosto assolaram a cidade. Registraram 102 casos dos quais 99 através de provas de soro-aglutinação, um confirmado pela necropsia e dois por hemocultura. A *Leptospira icterohaemorrhagiae* foi o agente causal em 88 casos, a *L. canicola* em 6, e a *L. grippityphosa* em 5; através de hemoculturas, foram isoladas a *L. grippityphosa* (1 amostra) pela primeira vez no Brasil, e a *L. icterohaemorrhagiae* (8 amostras).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AZEVEDO, R. & CORRÊA, M.O.A. — Considerações em torno da epidemia de leptospiroses na cidade do Recife em 1966. Aspectos epidemiológicos, laboratoriais e clínicos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28: 85—111, 1968.
2. MAGALHAES, M. & VERAS, A. — Aspectos sorológicos da leptospirose no Recife. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 12: 112—114, 1970.
3. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ — 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.
4. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE. Public Health Service. *Leptospiral serotype distribution list*. Atlanta, Ga., 1966.

Recebido para publicação em 24 de junho de 1972.

RESÍDUOS DE PESTICIDAS CLORADOS EM ALIMENTOS (1)

CHLORINATED PESTICIDE RESIDUES IN FOODS

WALKYRIA H. LARA (2)
HELOISA H. C. BARRETTO (2)

SUMMARY

LARA, W.H. & BARRETTO, H.H.C. — Chlorinated pesticide residues in foods. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 89-94, 1972.

Samples of several foods for sale in São Paulo, S.P., Brazil, such as rice, beans, potatoes, eggs and vegetables have been examined by means of the gas liquid chromatography method, with electron capture detector, in order to determine the chlorinated pesticide residues.

Hexachlorocyclohexane (BHC) alfa, beta and gama isomers were found in all the samples analysed. DDT was found in only few samples of the grains and vegetables. Other organochlorinated pesticides residues have not been found.

These results as well those of our previous surveys allowed us to calculate that the daily intake of BHC by the population, according to a certain diet, is 0,0004 mg/kg body wt/day. More than half of the daily intake is accounted for by foods of animal origin. The problem of remanescence of pesticides in foods in São Paulo differs from that found in European countries and in U.S.A., where the major contamination is due to DDT.

INTRODUÇÃO

Entre os vários aspectos da poluição ambiental, a remanescência de pesticidas clorados altamente tóxicos e persistentes é um dos que têm preocupado os pesquisadores e legisladores. Isto é demonstrado pelo número de investigações sobre os mesmos e leis que proibem ou regulamentam seu uso, como é o caso recente do DDT.

Resíduos de pesticidas podem atingir o homem por diferentes vias. A principal é representada pelos alimentos pois, colocado no final da cadeia alimentar, é o homem quem recebe e acumula os resíduos que os vegetais e animais já acumularam por sua vez.

O maior ou menor teor de resíduos de pesticidas nos alimentos varia com a natureza do

pesticida empregado, as características da planta ou animal, o tempo de aplicação, o intervalo entre esta e a colheita e, finalmente, com o tratamento que o produto sofre para consumo. O uso correto e adequado dos pesticidas não acarreta grande contaminação dos alimentos, mas sim o uso indiscriminado e excessivo de alguns pesticidas.

É importante um levantamento de dados que permitam conhecer qual a ingestão diária de resíduos de pesticidas clorados nos diferentes centros populacionais. Isto depende da análise de um grande número de fatores, entre os quais as próprias diferenças de hábitos alimentares. Pode-se proceder a uma análise direta dos alimentos já prontos para o consumo à mesa, em diferentes regiões geográficas, durante um certo espaço de tempo, como foi feito

(1) Realizado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz. Apresentado na 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, São Paulo, julho de 1972.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

por DUGGAN & LIPSCOMB⁶ ou analisar os alimentos na forma em que são oferecidos ao mercado e calcular a ingestão diária mediante uma dieta conhecida. Seguindo este último critério, analisamos diferentes grupos de alimentos, tais como são oferecidos ao consumo, na cidade de São Paulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de arroz, feijão, farinhas, hortaliças, óleos vegetais comestíveis e ovos de granja, perfazendo um total de quarenta e três amostras, foram adquiridas em mercados que abastecem a população de São Paulo e analisadas para determinação de resíduos de pesticidas clorados (Aldrin, BHC, Clordana, DDT, Heptacloro, Dieldrin e Endrin). Os grãos foram extraídos diretamente, sem lavar e sem escolher. Batata foi descascada e lavada e as hortaliças lavadas, como em uso doméstico. Em ovos, foram analisadas apenas as gemas, pois é nestas que se encontram os resíduos de pesticidas clorados. Foram analisados também três tipos de ração para galinhas, afim de comparar com os resíduos encontrados nos ovos.

Os métodos empregados para extração e análise foram os descritos em "Determinação de resíduos de pesticidas organoclorados em alimentos"⁷ e são iguais aos métodos oficiais da A.O.A.C.², com exceção do usado para extração em ovos, em que se empregou o processo descrito por ZABIK & DUGGAN JR¹² e que consiste em: Bater no liquidificador, por 10 min., 20 g de gema com 200 ml de hexano-metanol (1:1); filtrar em funil de Buchner com papel Whatman nº1; lavar o precipitado com mais 100 ml de hexano-metanol (1:1) e, em seguida, com 4 porções de 50 ml de hexano; transferir o filtrado para o funil de separação de 1 000 ml, com torneira de teflon; extrair com 4 porções de 100 ml de solução saturada de cloreto de sódio, afim de retirar o metanol. A solução em hexano é secada com sulfato de sódio anidro, concentrada em evaporador Kuderna-Danish e então purificada pelo "clean up" em coluna de Florisil.

A cromatografia em fase gasosa foi feita utilizando um cromatógrafo Varian Aerograph modelo 2.100-00, colunas de vidro em forma de U, de 1/4 de polegada de diâmetro interno e 6 pés de comprimento, uma com QF1-DC200 e outra com OV.225, como fase estacionária; as condições de otimização foram: 210°C para temperatura do detector, 200°C para o injetor e 190°C para a coluna; gás de arraste: Nitrogênio tipo U com fluxo igual a 30 ml por minuto.

A identificação dos picos no cromatograma foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões submetidos às mesmas condições de análise nas duas colunas. A determinação quantitativa foi feita pelo método de comparação de áreas.

Os resultados foram expressos em miligramas por quilo (mg/kg); os valores abaixo de 0,001 mg/kg, considerados traços, e 0,000, não aparecimento de pico no processo empregado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as amostras analisadas encontramos resíduos dos isômeros alfa, beta e gama, de hexaclorociclohexana (BHC). Resíduos de DDT foram encontrados em níveis bem mais baixos e com menor frequência, com exceção dos apresentados pelas amostras de feijão; estes níveis levam a crer que os grãos foram tratados para armazenamento.

Os quadros de I a V reúnem os resultados obtidos:

Os valores encontrados na literatura, referentes a resíduos de BHC, são de países onde DDT é mais amplamente usado e o uso de Lindana (isômero gama do BHC) substituiu o do BHC. Mesmo assim DUGGAN, BANY & JOHNSON⁵, nos Estados Unidos, em análise de 260 amostras de alimentos, encontraram

QUADRO I

Resíduos de pesticidas clorados em alimentos
Arroz, Feijão, Farinha

Nº	Amostra	BHC total mg/kg	DDT mg/kg
1	Arroz	0,008	0,000
2	Arroz	0,012	0,000
3	Arroz	0,010	0,000
4	Arroz	0,008	0,000
5	Arroz	0,005	0,000
6	Feijão preto	0,030	0,250
7	Feijão preto	0,050	0,250
8	Feijão preto	0,030	0,300
9	Feijão preto	0,004	Tr
10	Feijão jalo	0,004	Tr
11	Feijão rosinha	0,036	0,300
12	Feijão roxinho	0,140	0,250
13	Feijão branco	0,013	0,200
14	Feijão mulatinho	0,010	0,250
15	Farinha de mandioca	0,035	Tr
16	Farinha de mandioca	0,045	Tr
17	Farinha de mandioca	0,034	Tr
18	Fubá	0,011	Tr
19	Fubá	0,024	Tr

0,000 = Não aparecimento de pico no cromatograma

Tr = Traços — Valores abaixo de 0,001 mg/kg

QUADRO II

Resíduos de pesticidas clorados em alimentos
Hortaliças

Nº	Amostra	BHC total mg/kg	DDT mg/kg
1	Alface	0,007	Tr
2	Alface	0,020	Tr
3	Batata	0,001	0,000
4	Cenoura	0,024	Tr
5	Cenoura	0,013	Tr
6	Cenoura	0,025	Tr
7	Couve	0,012	Tr
8	Cebolinha	0,120	Tr
9	Salça	0,050	Tr
10	Salça	0,009	Tr
11	Tomate	0,007	Tr
12	Tomate	0,016	Tr
13	Tomate	0,010	Tr

0,000 = Não aparecimento de pico no cromatograma

Tr = Traços — Valores abaixo de 0,001 mg/kg

QUADRO III

Resíduos de pesticidas clorados em alimentos
Óleos comestíveis

Nº	Amostra	BHC total mg/kg	DDT mg/kg
1	Óleo de algodão	0,280	0,000
2	Óleo de algodão	0,200	0,000
3	Óleo de amendoim	0,130	0,000
4	Óleo de milho	0,430	0,020
5	Óleo de soja	0,210	0,000
6	Óleo de soja	0,270	0,000

0,000 = Não aparecimento de pico no cromatograma

QUADRO IV

Resíduos de pesticidas clorados em alimentos
Ovos de granja (gema)

Amostra	BHC total mg/kg	DDT mg/kg
1	0,018	Tr
2	0,038	Tr
3	0,200	Tr
4	0,036	Tr
5	0,020	Tr

Tr = Traços – Valores abaixo de 0,001 mg/kg

QUADRO V

Resíduos de pesticidas clorados em rações para galinhas

Nº	Amostra	BHC mg/kg	DDT mg/kg
1	Ração para pintos de 1 – 30 dias	0,014	0,000
2	Ração para frangas até início de postura	0,018	0,000
3	Ração para poedeiras	0,012	0,000

0,000 = Não aparecimento de pico no cromatograma

0,015 ppm em hortaliças, 0,008 ppm em batatas e traços de BHC em grãos e produtos de cereais, em amostras onde o teor de DDT encontrado variou de traços a 0,024 ppm em grãos e cereais, 0,004 a 0,010 em batatas e de 0,004 a 0,099 ppm em hortaliças. DICKES & NICHOLAS⁴, na Inglaterra, encontrou em ovos e legumes teores de gama-BHC de 0,06 a 0,20 e até 1,86 ppm, ao lado de 0,33 ppm de DDT.

A atual legislação brasileira³ não permite resíduos de BHC em alimentos; entretanto, o Grupo de Trabalho encarregado da elaboração das Normas Gerais sobre Remanescência de Pesticidas em Alimentos, da Comissão Nacional de Normas e Padrões de Alimentos do Mi-

nistério da Saúde já propôs uma nova norma para BHC, prevendo limites de resíduos não intencionais em carne (na gordura) de 1 ppm; leite e derivados (na gordura), 0,1 ppm e em ovos (na gema), 0,2 ppm, o que está mais de acordo com a realidade brasileira.

Com os valores médios das determinações de resíduos de BHC obtidos e os de trabalhos anteriores em água⁹, em leite¹ e em conservas de carne⁸, organizamos o quadro VI, onde são apresentados os valores médios de resíduos de BHC em alimentos, na região de São Paulo. Neste quadro pode-se ver claramente que são os alimentos de origem animal os que mais contribuem para maior ingestão de resíduos de BHC.

QUADRO VI

Valores médios de resíduo de BHC total encontrados em alimentos

Alimento	BHC total ppm
Água	0,002
Arroz	0,009
Feijão	0,035
Farinha de mandioca	0,038
Fubá	0,017
Hortaliças	0,024
Óleos	0,253
Ovos (gema)	0,025
Leite	0,032
Carne (gordura)	0,390
Queijo (gordura)	1,579

Com estes dados, calculamos que um indivíduo adulto, de 70 kg, consumindo os alimentos mais usados na região sul, segundo a dieta apresentada pelo levantamento elaborado pelo Ministério da Saúde¹¹, estaria ingerindo cerca de 0,0004 mg de BHC por quilo de peso corpóreo por dia. Como não está estabelecida a dose diária aceitável, para BHC, só podemos comparar este valor ao da dose diária aceitável proposta pela Comissão dos Peritos

em Resíduos de Pesticidas da FAO/OMS¹⁰ para Lindana, e que é de 0,0125 mg/kg peso corpóreo/dia.

CONCLUSÃO

Pela variedade de alimentos analisados e considerando os teores determinados anteriormente em leite, conservas de carne bovina e

em águas, chegamos à conclusão de que, na região de São Paulo, o resíduo de pesticida clorado mais difundido é o de BHC. Como o BHC técnico é um pesticida amplamente usado e, além do preço mais acessível, é bastante eficiente, dificilmente decrescerá, nos próximos anos, o teor de resíduos encontrados. Uma das medidas aconselháveis seria a substituição do BHC técnico por Lindana, isômero gama puro, único com ação inseticida, e para o qual já se tem valor de dose diária aceitável e já se estabeleceram tolerâncias.

Os resultados até agora obtidos indicam que o problema de remanescente de pesticidas em alimentos na região de São Paulo é bastante diverso do encontrado em países europeus e nos Estados Unidos, onde a contaminação maior é devida ao DDT e onde Lindana substituiu o BHC técnico.

RESUMO

LARA, W.H. & BARRETO, H.H.C. — Resíduos de pesticidas clorados em alimentos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 89-94, 1972.

Amostras de vários alimentos expostos ao consumo na cidade de São Paulo, como arroz, feijão, batata, ovos e legumes, foram examinadas pelos métodos de cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons, afim de determinar resíduos de pesticidas clorados.

Os isômeros alfa, beta e gama de Hexaclorociclohexana (BHC) foram encontrados em todas as amostras analisadas. DDT foi encontrado apenas em poucas amostras de cereais e legumes. Outros organoclorados, como aldrin, dieldrin e heptacloro não foram encontrados.

Estes resultados, reunidos aos anteriormente obtidos em leite, carne e águas, permitem calcular a ingestão diária de resíduos de BHC pela população, segundo uma certa dieta, no valor de 0,0004 mg/kg peso corpóreo/dia; nesta, os alimentos de origem animal contribuem com as maiores proporções de resíduo.

O problema de remanescente de pesticidas em alimentos em nosso meio é bastante diverso do encontrado em países europeus e nos Estados Unidos, onde a maior contaminação se deve ao DDT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, M.E.W. & BARRETTO, H.H.C. — Resíduos de pesticidas clorados em leite consumido em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31: 13-20, 1971.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis*. 11th ed. Washington, A.O.A.C., 1970.
3. BRASIL. Comissão Permanente de Aditivos para Alimentos — *Resolução nº 23/66*. Diário Oficial da União, Rio de Janeiro, 22 fev. 1967. p. 2193.
4. DICKES, G.J. & NICHOLAS, P.V. — A survey of selected foodstuffs for certain pesticide residues. *J. Ass. Publ. Anal.*, 7: 14-21, 1969.
5. DUGGAN, R.E.; BANY, H.C. & JOHNSON, L.Y. — Pesticide residues in total diet samples (II). *Pestic. Monit. J.*, 1(2): 2-12, 1967.
6. DUGGAN, R.E. & LIPSCOMB, G.Q. — Dietary intake of pesticide chemicals in the United States (II) June 1966 — April 1968. *Pestic. Monit. J.*, 2: 153-162, 1969.
7. INSTITUTO ADOLFO LUTZ — Determinação de resíduos de pesticidas organoclorados em alimentos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 125-132, 1971.
8. LARA, W.H.; BARRETTO, H.H.C. & TAKAHASHI, M.Y. — Resíduos de pesticidas clorados em conservas de carne bovina. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31: 63-70, 1971.
9. LARA, W.H. & BARRETO, H.H.C. — Resíduos de pesticidas clorados em águas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32, 1972. [No prelo].
10. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ — Résidus de pesticides dans les produits alimentaires. Rapport de la réunion conjointe du Group de travail FAO d'experts des résidus de pesticides et du Group OMS d'experts des résidus de pesticides, tenue en 1969. Genève, O.M.S., 1970. Sér. Rapp. Techn. n.º 458.
11. SANTIAGO, O.F. — *Consumo de alimentos*. [Rio de Janeiro], Ministério da Saúde, 1971. [Mimeografado].
12. ZABIK, M.E. & DUGGAN Jr., L.R. — Potential of freeze drying for removal of chlorinated hydrocarbon insecticides from eggs. *J. Food Sci.*, 36: 87-92, 1971.

Recebido para publicação em 18 de julho de 1972.

NOTA TÉCNICA

MEIO PARA DIFERENCIAÇÃO DA TRIBO *PROTEEA*E DE OUTRAS ENTEROBACTÉRIAS⁽¹⁾

A SIMPLIFIED MEDIUM FOR DIFFERENTIATION OF MEMBERS OF THE TRIBE *PROTEEA*E FROM OTHER ENTEROBACTERIA

GIL VITAL ALVARES PESSÔA (2)
DILMA SCALA GELLI (2)

SUMMARY

PESSÔA, G.V.A. & GELLI, D.S. — A simplified medium for differentiation of members of the tribe *Proteae* from other enterobacteria. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 95-96, 1972.

A new differential culture medium for the preliminary isolation of enterobacteria is proposed. This medium differentiates bacteria of the tribe *Proteae* from the other *Enterobacteriaceae*. For this purpose, the association of L-tryptophan and ferric citrate was used.

INTRODUÇÃO

A característica da maioria dos membros da tribo *Proteae* de não fermentarem a lactose torna, freqüentemente, difícil o isolamento de enterobactérias patogênicas, uma vez que a quase totalidade dos meios diferenciais e diferenciais-seletivos empregados no diagnóstico bacteriológico de enterobactérias é baseada na fermentação deste açúcar.

Esse problema é agravado pela peculiaridade de certos membros dessa tribo formarem bafo em meios sólidos, tornando-os muitas vezes inúteis para o isolamento de outras bactérias. Esse fenômeno foi muito bem visto por NAYLOR¹, em 1964.

Baseado na capacidade dos membros da tribo *Proteae* desaminarem o L-triptofano, propriedade que os diferencia de todos os outros membros da família *Enterobacteriaceae*, foi desenvolvido um meio que, além de permitir a distinção de colônias fermentadoras

rápidas de lactose das não fermentadoras desse açúcar, também permitiu a diferenciação direta dos membros dessa tribo.

As colônias de *Proteus* e *Providencia* apresentam uma coloração marron característica, enquanto que as fermentadoras da lactose se apresentam vermelhas. Também foi observado que para o *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris* foi sempre inibida a formação de bafo, fato esse já referido pelos autores em trabalho anterior².

MEIO

L — triptofano	4,0	g
Citrato de ferro amoniacal	2,0	g
Lactose	10,0	g
Cloreto de sódio	5,0	g
Cristal violeta	0,001	g
Peptona	20,0	g
Sais Biliares	1,5	g
Ágar	15,0	g
Vermelho neutro	0,03	g
Água-destilada	1 000	ml
pH	7,0	

(1) Realizado na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz, SP.

RESUMO

PESSÔA, G.V.A. & GELLI, D.S. – Meio para diferenciação da tribo *Proteae* de outras enterobactérias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 95-96, 1972.

É proposto um novo meio diferencial para isolamento preliminar de enterobactérias. Este meio diferencia bactérias da tribo *Proteae* de outras enterobactérias. Para este fim foi utilizada a associação de L-triptofano e citrato de ferro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NAYLOR, P.G.D. – The effect of electrolytes or carbohydrates in a sodium chloride deficient medium on the formation of discrete colonies of *Proteus* and the influence of these substances on growth in liquid culture. *J. Appl. Bact.*, 27(3): 422, 1964.
2. PESSÔA, G.V.A.; GELLI, D.S.; FIGUEIREDO, M.E.F. & BRANDÃO, J.F. – Ação da associação L-Triptofano e citrato de ferro amoniacal sobre a formação de bafo de *Proteus*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, 31: 39-42, 1971.

Recebido para publicação em 3 de agosto de 1972.

MEIOS DE RUGAI E LISINA—MOTILIDADE COMBINADOS EM UM SÓ TUBO PARA A IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE ENTEROBACTÉRIAS (1)

MEDIUM OF RUGAI AND LYSINE-MOTILITY COMBINED IN ONE SINGLE TUBE FOR THE PRESUMPTIVE IDENTIFICATION OF ENTEROBACTERIACEAE

GIL VITAL ALVARES PESSÔA (2)
ENY APARECIDA MATHEUS DA SILVA (2)

SUMMARY

PESSÔA, G.V.A. & SILVA, E.A.M. — Medium of Rugai and lysine-motility combined in one single tube for the presumptive identification of enterobacteriaceae. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 97-100, 1972.

With the purpose of making the presumptive differentiation of enterobacteria a faster and easier process, it was developed a culture medium where one could observe in a single tube the fermentation of saccharose and glucose, urea hydrolysis, gas production, H₂S and indol, deamination of the L-tryptophan, decarboxilization of lysine and motility. Preliminary tests with enterobacteria showed total reproducibility and adequate visualization of the differential reactions.

INTRODUÇÃO

Atualmente, na identificação de membros da família *Enterobacteriaceae* é frequente o uso de testes múltiplos nos quais a pesquisa da motilidade é o denominador comum.

O propósito deste trabalho foi desenvolver um meio que possibilitasse a pesquisa da motilidade e descarboxilação da lisina concomitantemente com as reações obtidas no meio clássico de RUGAI & ARAUJO¹.

Assim, num só tubo poderiam ser verificadas a fermentação ou não da sacarose e glicose, produção de gás, H₂S e indol, hidrólise da uréia, desaminação do L-triptofano, descarboxilação da L-lisina e motilidade, tornando mais rápida e simples a identificação das enterobactérias, com conseqüente economia de tempo, material e trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

O meio é envasado em tubos com 2 fases separadas por uma interfase.

1. Fase inferior

Meio para descarboxidação da lisina-motilidade:

Extrato de levedura (3)	3,0 g
Dextrose	0,5 g
KNO ₃	0,5 g
L-lisina (4)	5,0 g
Ágar	4,0 g
Púrpura de bromocresol	0,02g
H ₂ O destilada	1 000 ml
pH	6,4

Aquecer para completa dissolução do ágar.

(1) Realizado na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

(3) Difco.

(4) Aginomoto.

2. *Interfase*

a) Cera de carnaúba, tipo carnaúba flor⁽¹⁾

Ponto de fusão	83—85°C
Umidade máxima	1,0%
Índice de iodo	8—12
Índice de acidez	2,5—9,0
Índice de éster	74—82
Índice de saponificação	77—99

b) Vaselina líquida (óleo mineral branco)

A porcentagem ótima da mistura vaselina-carnaúba⁽²⁾ foi a de 90 ml de vaselina para 10 g de cera de carnaúba.

3. *Fase superior*

Meio de Rugai, preparado de acordo com a indicação dos autores.

Colocar em tubo de 12 x 120 mm, limpo e seco, tamponado com algodão hidrófilo, uma quantidade de Vascar suficiente para formar um anel de aproximadamente 1 mm de espessura. Distribuir no tubo o meio de lisina-motilidade em quantidades de aproximadamente 1,5 ml.

Autoclavar a 121°C por 20 minutos.

Esfriar o tubo em pé para que haja a formação de um perfeito menisco vedatório de Vascar.

A seguir, distribuir o meio de Rugai na quantidade de 3 ml em cada tubo, aproveitando a manobra para impregnar o tampão com reativo para indol, de acordo com a técnica original. Deixar esfriar inclinado, de tal maneira que a base seja aproximadamente 1/3 da altura do ápice.

Fazer prova de esterilidade, em estufa a 37°C por 24 horas.

Para utilização, inocular o material com agulha até o fundo do tubo, retirá-la cuidado-

samente e fazer, em seguida, semeadura no ápice, da maneira habitual.

DISCUSSÃO

O meio modificado vem sendo usado experimentalmente, há mais de 2 meses em mais de 500 coproculturas, pela Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz; além das informações fornecidas pelo meio de Rugai, clássico, este meio possibilita diferenciar o gênero *Citrobacter* do Grupo *Salmonella Arizona*, bem como *E.coli* anaerogênico (Grupo *Alkalecens-Dispar*) do gênero *Shigella*, pela descarboxidação da lisina.

O meio permite:

1. Pela descarboxidação da lisina

a) Diferenciação entre o gênero *Citrobacter* e o grupo *Salmonella-Arizona*.

b) Diferenciação entre *Escherichia coli* anaerogênica (grupo *Alkalecens-Dispar*) e o gênero *Shigella*.

2. Pela verificação da motilidade

a) Distinção de *E. coli* lisina-negativas dos membros do gênero *Shigella*.

b) Seleção rápida de linhagens de *Salmonella* com motilidade adequada para serem submetidas à prova de aglutinação flagelar.

As espécies do gênero *Proteus*, no meio estudado, sempre determinaram alcalinização da base, simulando ter havido descarboxilação da L-lisina, por mecanismo não esclarecido. Entretanto, a desaminação do L-triptofano e a hidrólise da uréia são suficientes para caracterização desse gênero.

(1) Orniex

(2) Denominada "Vascar" pelos autores.

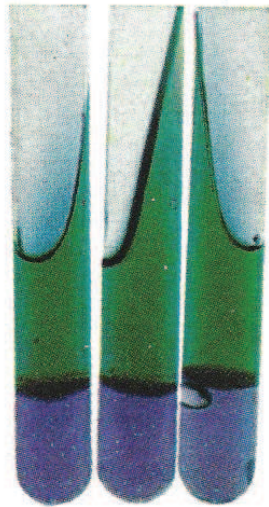


Fig. 1 – Meio não inoculado.

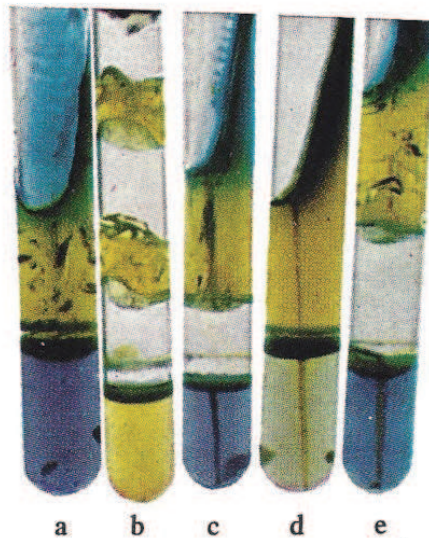


Fig. 2 – Reações em meios inoculados

- a) Lisina descarboxilase positiva, motilidade positiva.
- b) Lisina descarboxilase negativa, motilidade positiva.
- c e e) Lisina descarboxilase positiva, motilidade negativa.
- d) Lisina descarboxilase negativa, motilidade negativa.

Agradecimento

Agradecemos ao Dr. Germínio Nazário, Chefe da Seção de Equipamentos Especializados do Instituto Adolfo Lutz, pela orientação e sugestão de natureza química.

RESUMO

PESSÔA, G.V.A. & SILVA, E.A.M. — Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 97-100, 1972.

Com a finalidade de tornar mais rápida e simples a diferenciação presuntiva de enterobactérias, foi desenvolvido um meio de cultura onde se pode observar num só tubo a fermentação da sacarose e glicose, hidrólise da

uréia, produção de gás, H₂S e indol, desaminação do L-triptofano, descarboxilação da lisina e motilidade. Provas preliminares com enterobactérias demonstraram total reprodutibilidade e adequada visualização das reações diferenciais.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. RUGAI, E. & ARAUJO, A. — Meio de cultura para identificação presuntiva de bacilos intestinais Gram-negativos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28: 79-83, 1968.

Recebido para publicação em 3 de agosto de 1972.

ESTUDO POLAROGRAFICO DE ALGUNS CORANTES USADOS EM ALIMENTOS (1)

POLAROGRAPHIC STUDY OF SOME PERMITTED DYES IN FOOD

GERMÍNIO NAZÁRIO (2)
ODAIR ZENEON (2)

SUMMARY

NAZÁRIO, G. & ZENEON, O. – Polarographic study of some permitted dyes in food. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 101-104, 1972.

The polarographic behaviour of some dyes as artificial food color, according to Color Index – Food blue 1 (nº 73015), Food orange 3 (nº 15980), Food red 2 (nº 14815), Food red 4 (nº 16045), Food red 9 (nº 16185), Food red 14 (nº 45430), Food yellow 2 (nº 13015), Food yellow 3 (nº 15985), Food yellow 4 (nº 19140) and Indanthrene blue (nº 69800) was studied.

The polarographic reduction of dyes was realized in buffer solution of different pH. Defined polarographic waves were obtained only for azo dyes. The half-wave potential ($E_{1/2}$) was determined. The data were expressed in a table.

INTRODUÇÃO

O objetivo deste trabalho é o estudo do comportamento polarográfico de alguns corantes permitidos para o uso alimentar.

Foram estudados corantes permitidos no Brasil, referentes a “Normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos” regulamentadas pelo Decreto n.º 55871/69 (3) e de acordo com o Color Index (8):

Há referências sobre o comportamento de azo-corantes quanto à redução ao eletrodo gotejante de mercúrio. HOANG (1,2) estudou a redução polarográfica de orange II e do amarelo metanílico em solução tamponada de diferentes pH. A redução resultou na formação do hidrazo derivado. O potencial de meia onda ($E_{1/2}$) apresenta um aumento em valor negativo com aumento do pH.

Um tipo de hidroxí-azocorante foi estudado por PUSHKAREVA & MURSHTEIN (7). Este corante foi polarografado em tampão acetato de pH = 6,2 e meio etanólico. Constataram uma

variação do potencial de meia onda em função de uma série de grupos ligados na molécula.

MIZUMOYA & KITA (6) estudaram o comportamento polarográfico de azocorantes em alimentos. O estudo foi realizado em solução tampão e $\text{Me}_4\text{NC1}$ 0,1M como eletrólito suporte. Obtiveram para todos os corantes ondas polarográficas bem definidas em meio ácido, exceto para o food red 102. O processo envolveu dois elétrons.

IJIMA (3) estudou o efeito de orto substituintes sobre o potencial de meia onda em duas séries de hidroxí-azocorantes. Observou que os substituintes doadores de elétrons produzem uma resistência à redução do azo grupo e substituintes eletroativos produzem um efeito contrário.

Outros dois tipos de corantes azóicos foram estudados polarograficamente por MILLEFIORI & CAMPO (4,5): 1-fenilazo-2-naftol e 4-fenilazo-1-naftol. A redução desses dois tipos de corantes foi realizada em solução alcoólica (48%) e em meio tampo-

(1) Realizado na Seção de Equipamentos Especializados do Instituto Adolfo Lutz.

Apresentado no 12º Congresso da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, realizado em Salvador, julho, 1970.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

(3) Após ter sido completado este estudo, foram introduzidos na Legislação Brasileira os corantes: Azul brilhante (nº 42090) e Ponceau 4R ou Nova Coccina (nº 1655).

QUADRO I

Corantes estudados

Nome Comum	Nome químico	Número no Color Index (2ª. ed., 1956-58)
Amarelo ácido	Aminofenilsulfonato de sódio azofenilsulfonato de sódio	13015
Amarelo crepúsculo	Sal dissódico de ácido (sulfo-4' fenilazo-1') – 1 hidróxi – 2 naftaleno sulfônico – 6	15985
Azul de indantreno RS	N,N'-Dihidro-antraquinona azina 1,2,1',2'	69800
Azul de indigotina	Sal dissódico do ácido Indigotina- dissulfônico – 5,5'	73015
Bordeaux S	Sal trissódico do ácido (sulfo-4' naftilazo-1) – 1 hidróxi-2 nafta- leno dissulfônico-3,6	16185
Eritrosina	Sal dissódico da tetraiodofluores- ceína	45430
Escarlate GN	Sal dissódico do ácido (sulfo-6'm- xililazo-1') – 2 hidróxi-1 naftaleno sulfônico-5	14815
Laranja GGN	Sal dissódico do ácido (sulfo-3'- fenilazo-1') – 1 hidróxi-2 naftaleno sulfônico-6	15980
Tartrazina	Sal trissódico do ácido (p-sulfo- fenilazo)-4 (p-sulfofenil)- 1 hi- droxi-5 pirazol carboxílico-3	19140
Vermelho sólido E	Sal dissódico do ácido 1-(4-sulfo- naftilazo)-2 naftil 6-sulfônico	16045

nado de diferentes pH segundo Britton-Robinson. No primeiro tipo houve a clivagem da ligação N:N, dando aminas correspondentes como produto de redução e, no segundo, o azo grupo transformou-se em hidrazo derivado somente.

MATERIAL E MÉTODOS

Os corantes utilizados para tal estudo são considerados puros, tanto por espectrofotometria como por titulometria (titulação com cloreto de titânio).

Foi utilizado para o tratamento polarográfico solução aquosa a 0,1% de cada corante. O aparelho utilizado foi o polarógrafo E 261R (*).

(*) Metrhom.

Utilizaram-se, como eletrólito suporte, soluções tampões de pH determinados. Essas soluções foram:

- 1) Mac-Ilvaïne, cuja variação do pH era: 2,2; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0.
- 2) Michaelis, cuja variação do pH era: 9,23; 9,94; 11,04 e 12,32.

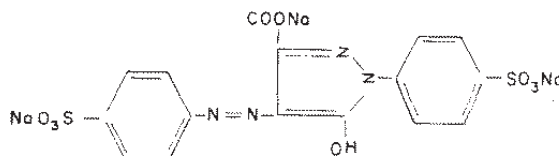
As condições polarográficas impostas foram:

Voltagem inicial (starting voltage)	0
Escala de voltagem (voltage range)	-1 V
Amortecimento (damping)	3
Compensação de corrente de carga (compensa- tion of charging)	$5 \cdot 10^{-8}$ A/mm

A fim de eliminar o oxigênio dissolvido na solução, borbulhou-se nitrogênio puro durante 5 minutos.

Como supressor de máximo polarográfico foi usada solução aquosa de gelatina a 0,1% e solução aquosa de Triton X 100(*) a 0,1%.

Provavelmente o aparecimento de duas ondas polarográficas na redução da Tartrazina é uma consequência de sua estrutura: presença de azo grupo e do grupo pirazólico.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições experimentais não se obteve onda polarográfica para os corantes: Azul de indigotina, Azul de indantren e Eritrosina. Para os demais corantes, obtiveram-se ondas polarográficas definidas com uma só inflexão, exceto para a Tartrazina onde houve duas inflexões. Concluiu-se, portanto, que somente corantes azóicos foram reduzidos polarograficamente nas condições experimentais.

Exceto os corantes Bordeaux S e Vermelho sólido E, os demais apresentaram máximos polarográficos.

Foi determinado para cada corante o potencial de meia onda pelo processo geométrico comum. Os resultados desse potencial estão representados no quadro II. Observou-se um aumento (em valor negativo) do potencial de meia onda com o aumento do pH para cada corante em estudo.

QUADRO II

Potenciais de meia onda (em V) dos corantes estudados

Corantes Estudados	Tampão Mac-Ilvaine							Tampão Michaelis			
	pH 2,2	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 9,23	pH 9,94	pH 11,04	pH 12,32
Amarelo Ácido	-0,337	-0,385	-0,410	-0,477	-0,537	-0,576	-0,645	-0,667	-0,746
Vermelho Sólido E	-0,113	-0,185	-0,265	-0,359	-0,461	-0,533	-0,552	-0,657	-0,707	-0,725	-0,746
Amarelo Crepúsculo	-0,125	-0,209	-0,323	-0,425	-0,537	-0,581	-0,637	-0,715	-0,735	-0,759	-0,765
Bordeaux S	-0,127	-0,227	-0,317	-0,417	-0,489	-0,555	-0,605	-0,661	-0,673	-0,677	-0,681
Laranja GGN	-0,133	-0,195	-0,321	-0,439	-0,497	-0,545	-0,581	-0,679	-0,747	-0,761	-0,813
Escarlate GN	-0,139	-0,253	-0,341	-0,380	-0,537	-0,613	-0,679	-0,755	-0,775	-0,777	-0,789
Tartrazina	-0,219	-0,303	-0,373	-0,421	-0,439	-0,513	-0,597	-0,797	-0,817
				-0,521	-0,583	-0,657	-0,751				

(*) Tenso ativo fabricado por Rohm & Haas Co., Philadelphia, U.S.A.

RESUMO

NAZÁRIO, G. & ZENEBON, O. – Estudo polarográfico de alguns corantes usados em alimentos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 101-104, 1972.

Os autores estudaram o comportamento polarográfico de alguns corantes permitidos em alimentos. A redução polarográfica foi realizada em meio tamponado de diferentes pH e ondas polarográficas definidas somente para corantes do tipo azóico.

Observaram um aumento, em valor negativo, do potencial de meia onda com o aumento do pH para cada corante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HOANG, T. N. – Reduction of orange II at dropping-mercury electrode. A polarographic study. *J. Chim. Phys.*, 35: 345–349, 1938.
2. HOANG, T. N. – La réduction de l'orangé 2 et du jaune métanile à l'électrode à gouttes de mercure. *C.R. Séanc. Soc. Biol.*, 207: 989–991, 1938.
3. IJIMA, T. – Polarography of azo dyes. Effect of ortho-substituents on the half-wave potential. *Rev. Polarogr.*, 14(3/6): 317–321, 1967 apud *Chem. Abstr.* 71(7): 31332e, 1969.
4. MILLEFIORI, S. & CAMPO, G. – Polarographic reduction of azo compounds. I. 1-Phenylazo-2-naphthols. *Ann. Chim. (Rome)*, 59(2): 128–137, 1969 apud *Chem. Abstr.*, 71(4): 18219c, 1969.
5. Ibid. II. 4-Phenylazo-1-naphthols. *Ann. Chim. (Rome)*, 59(2): 138–154, 1969 apud *Chem. Abstr.*, 71(4): 18219d, 1969.
6. MIZUMOYA, Y. & KITA, T. – Polarographic study of artificial food colorings. *Bunseki Kagaku* 14(5): 437–443, 1965 apud *Chem. Abstr.* 63(5): 6235f, 1965.
7. PUSHKAREVA, Z. V. & MURSHTEIN, M. K. – Polarographic reduction and infrared spectra of some o-hydroxy azo dyes. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 156(2): 389–392, 1964 apud *Chem. Abstr.* 63(3): 3234g, 1964.
8. SOCIETY OF DYERS AND COLOURISTS – *Color index*. 2.ed. Bradford, S.D.C., 1956–1958. v. 1, pág. 1261, 1775, 1776, 1781, 1784, 1785, 1800.

Recebido para publicação em 7 de agosto de 1972.

AMINOÁCIDOS DE HIDROLISADOS DE PROTEÍNA DE SOJA DOSAGEM DE ÁCIDO GLUTÂMICO (1)

DETECTION OF AMINOACIDS IN PROTEIN HYDROLYSATES OF SOYBEAN DETERMINATION OF GLUTAMIC ACID

MARIA ELISA WOHLERS DE ALMEIDA(2)
ANTONIA MATTOS SIMÃO(2)

SUMMARY

ALMEIDA, M.E.W. & SIMÃO, A.M. — Detection of aminoacids in protein hydrolysates of soybean. Determination of glutamic acid. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32:105-112, 1972.

Bidimensional paper chromatography was applied in order to separate the different aminoacids of industrial soybean protein hydrolysates, with satisfactory results.

Some modification were introduced into the classical methods for aminoacid detection and into the evaluation of glutamic acid.

The spots corresponding to the glutamic acid (standard and sample) had been cut out, eluted, and its contents of glutamic acid were determined by means of spectrophotometry.

INTRODUÇÃO

O emprego da soja e de produtos dela derivados vem sendo cada vez mais difundido na alimentação humana, com a finalidade de substituir a proteína de origem animal ou de complementar uma deficiência protéica.

Nos países asiáticos, os produtos de soja são largamente empregados no preparo de inúmeros alimentos, aos quais transmitem um típico *flavor*, como também fornecem, em extensão considerável, os aminoácidos necessários à dieta normal.

Sob o ponto de vista da nutrição, a proteína de soja tem um alto valor biológico e, neste aspecto, assemelha-se mais à proteína animal do que qualquer outra vegetal⁷.

A literatura sobre o valor nutritivo da proteína de soja tem sido revista de maneira exaustiva por vários autores, podendo-se citar entre eles o excelente resumo de CIRCLE & JOHNSON³.

Estudos mais recentes realizados por ALTHOFF², em seres humanos, indicam que a proteína de soja é uma proteína completa e pode substituir a animal na dieta humana, necessitando, apenas, de um pequeno suplemento de metionina e lisina.

A farinha de soja é empregada no preparo de numerosos produtos alimentícios, tais como: pães, bolos, biscoitos, bolachas, farinhas lácteas, produtos dietéticos, molhos e outros. A tendência atual da indústria, entretanto, é a de introduzir, além da farinha de soja, hidrolisados de proteína de soja não só para o enriquecimento protéico de produtos alimentícios, como também por outras qualidades intrínsecas como ação espessante, sabor característico e pela sua maior assimilação.

Com a finalidade de avaliar a qualidade protéica de hidrolisados de proteína de soja existentes no comércio, analisamos várias amostras detectando os aminoácidos e dosando o ácido glutâmico presente.

(1) Realizado no Serviço de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 9 amostras de hidrolisados de proteína de soja; todos os produtos, enviados para análise ao Instituto Adolfo Lutz, foram preparados nas respectivas indústrias, por hidrólise ácida, a partir de farinha de soja desengordurada.

Identificamos os aminoácidos por cromatografia em papel e a dosagem do ácido glutâmico foi feita por espectrofotometria.

O método usado foi baseado em várias técnicas já publicadas^{1, 6, 10, 11}. Entretanto, foi introduzido um novo artifício para a identificação dos aminoácidos e foram estipuladas novas condições de trabalho; montamos, assim, um método, qualitativo e quantitativo que, embora trabalhoso, mostrou-se adequado às necessidades do momento.

1. Equipamento

Papel Whatmann nº 1 (20 x 20 cm)
Cuba cromatográfica de Thomas
Micro-seringas
Espectrofotômetro Coleman Junior

2. Solventes

1ª fase ou 1º solvente

n-butanol-ácido acético glacial-água
(4:1:5)

Coloque o butanol, o ácido e a água em um funil de separação, agite, decante e utilize a fase superior.

2ª fase ou 2º solvente

Fenol-NH₄OH 3% (4:1)

3. Revelador

Solução de ninhidrina 0,2% em n-butanol saturado de água.

4. Preparo da amostra

Pese 100 mg de amostra, dissolva e dilua com água a 10 ml (se houver dificuldade na dissolução, adicione algumas gotas de HCl).

Transfira 1 ml da solução para um outro balão volumétrico de 10 ml e complete o volume com álcool isopropílico a 10%. Com esta solução são preparados os cromatogramas.

5. Padrões dos aminoácidos

Prepare de maneira idêntica à da amostra e nas mesmas condições.

6. Desenvolvimento do cromatograma

Foram colocados sobre o papel 20 µl da solução da amostra e 10 µl da solução padrão, de acordo com a fig. 1:

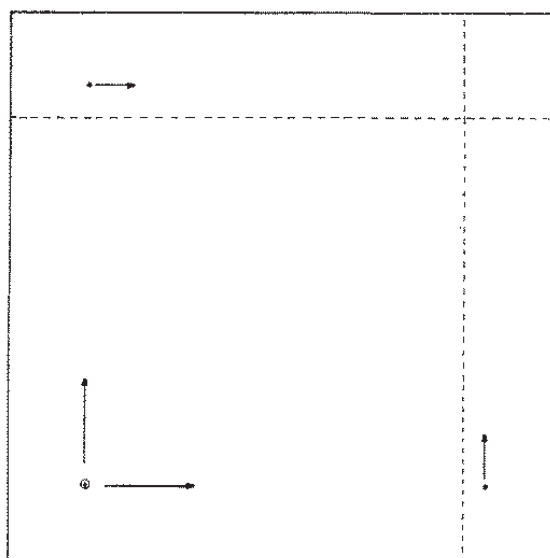


Fig. 1. – Esquema de aplicação da amostra e do padrão

- ⊙ Amostra
- Padrão
- Limite superior a que o solvente deve alcançar

Assim procedendo, os aminoácidos foram identificados pela posição indicada pelo padrão no próprio cromatograma e não pelos R_f ou pela posição relativa das manchas, como se faz usualmente.

Foram observadas as seguintes condições:
a) O fenol não deve apresentar alteração de cor.

b) Após o desenvolvimento do cromatograma com a 1ª fase, o papel é secado em estufa a 40°C e, logo em seguida, desenvolvido com a 2ª fase (não deixe para correr o cromatograma com o solvente fenol no dia seguinte).

c) Após o desenvolvimento com a 2ª fase, o cromatograma pode ser revelado no dia seguinte, mas deve ser guardado ao abrigo da luz. Antes de revelar, se necessário, seque o cromatograma a 40°C.

d) Revele o cromatograma com a solução de ninhidrina, seque em estufa a 40°C durante 2 horas, sendo os aminoácidos identificados no cromatograma de acordo com a posição indicada pelo ponto de intersecção de linhas ortogonais partindo das manchas correspondentes aos padrões (fig. 2 a 10).

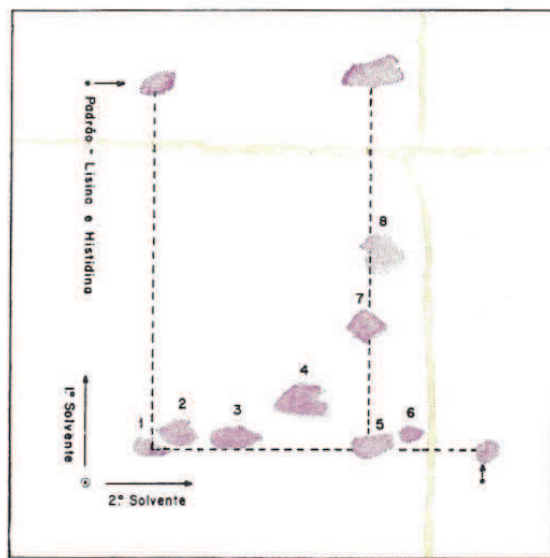


Fig. 3 — Identificação da histidina

- | | |
|--------------------|------------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
| ⊙ Amostra | ● Padrão: Histidina e lisina |

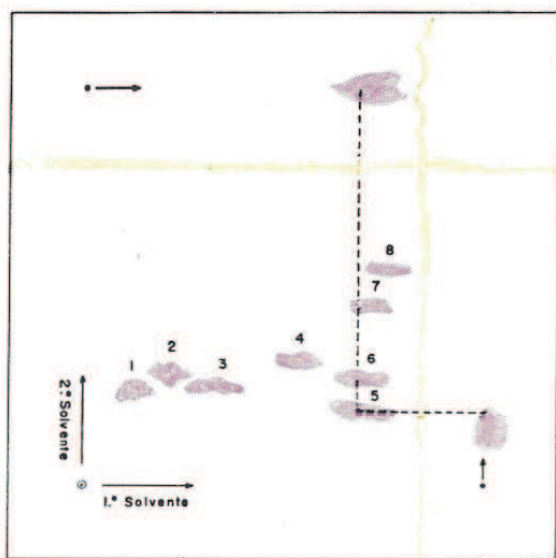


Fig. 2 — Identificação da lisina

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
| ⊙ Amostra | ● Padrão: Lisina |

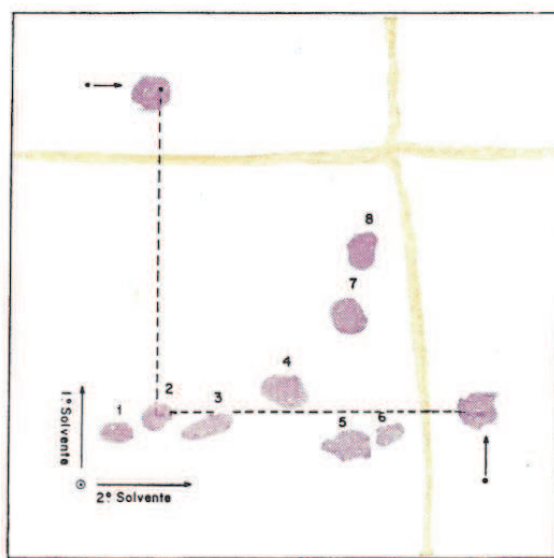


Fig. 4 — Identificação do ácido glutâmico

- | | |
|--------------------|---------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
| ⊙ Amostra | ● Padrão: Ácido glutâmico |

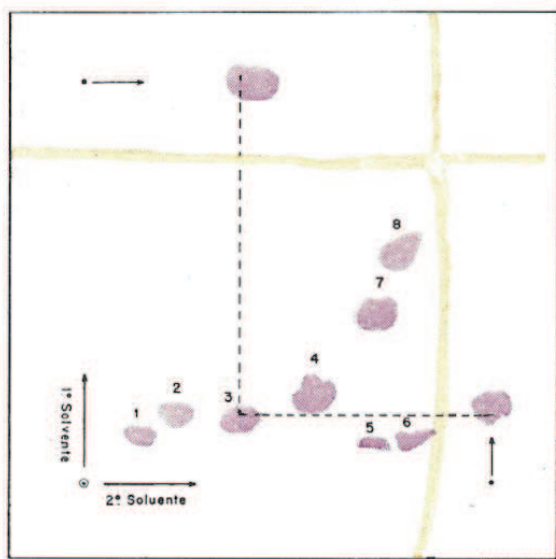


Fig. 5 – Identificação da treonina

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
- ⊙ Amostra ● Padrão: Treonina

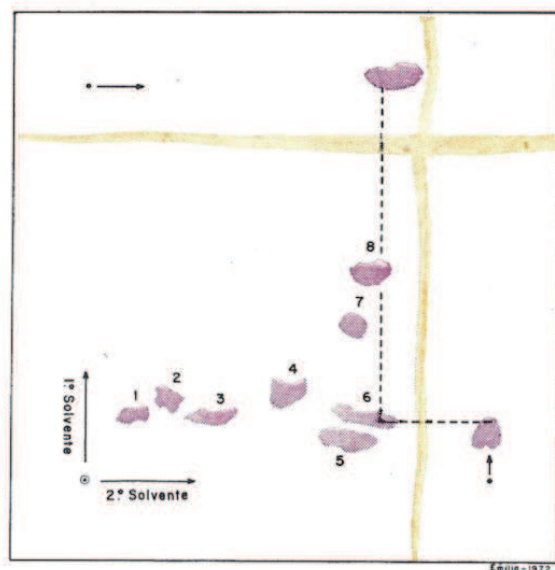


Fig. 7 – Identificação da arginina

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
- ⊙ Amostra ● Padrão: Arginina

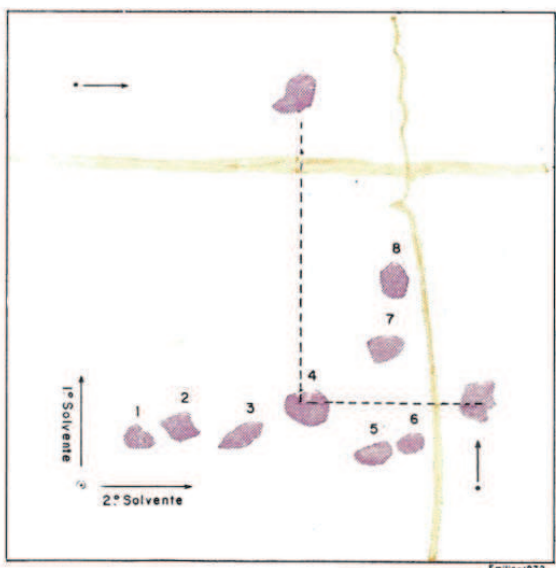


Fig. 6 – Identificação da alanina

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
- ⊙ Amostra ● Padrão: Alanina

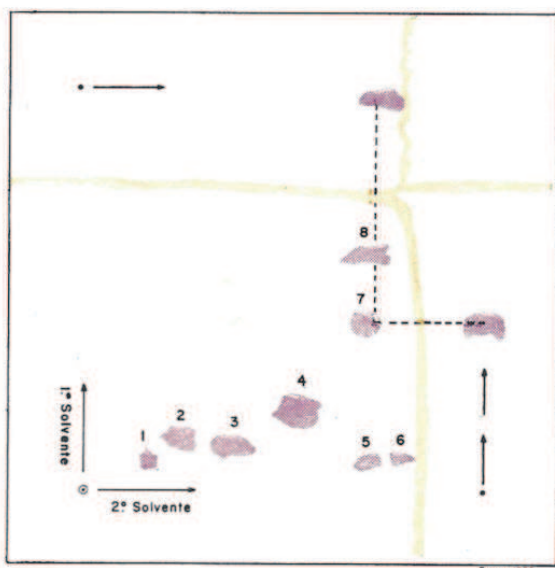


Fig. 8 – Identificação do triptofano

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
- ⊙ Amostra ● Padrão: Triptofano

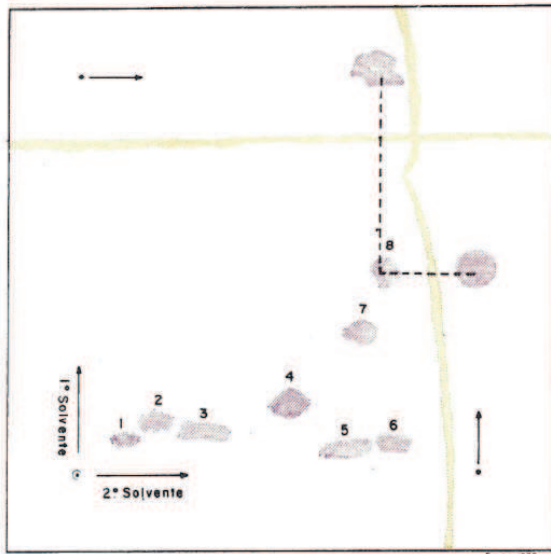


Fig. 9 – Identificação da leucina

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
- Amostra ● Padrão: Leucina

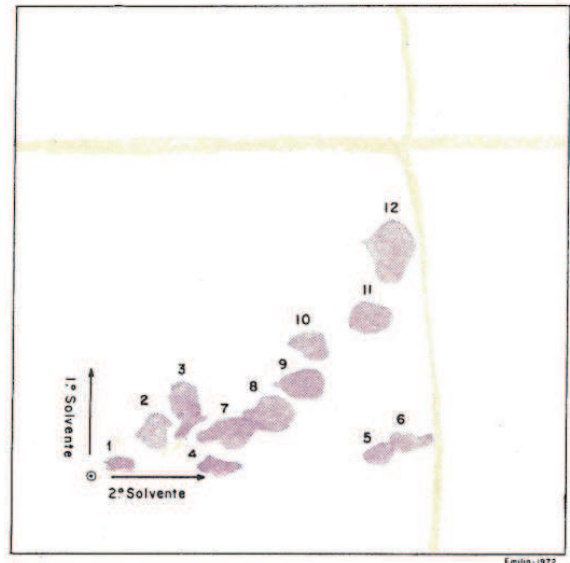


Fig. 11 – Aminoácidos de hidrolisados de cabelo humano (amostra a)

○ Amostra

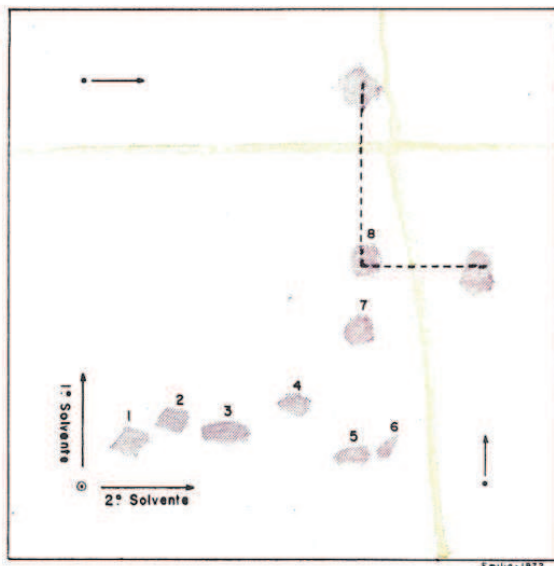


Fig. 10 – Identificação da leucina e isoleucina

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
- Amostra ● Padrão: Leucina e isoleucina

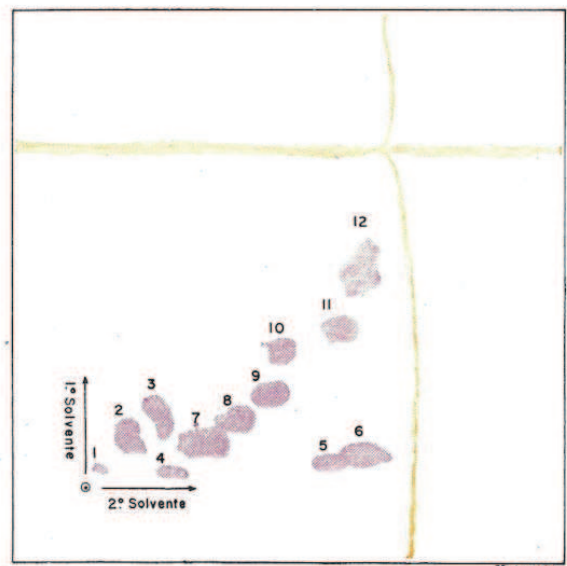


Fig. 12 – Aminoácidos de hidrolisados de cabelo humano (amostra b)

○ Amostra

7. Dosagem do ácido glutâmico

Logo após a identificação do ácido glutâmico, as manchas correspondentes ao padrão e ao ácido são recortadas, observando-se as mesmas áreas do papel de filtro; o mesmo foi feito com um branco retirado de um ponto do papel do próprio cromatograma.

Para facilitar a extração, as áreas retiradas são repicadas, colocadas dentro do tubo do aparelho de Colleman e tratadas com a seguinte solução:

Solução de $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ (Solução estoque) 20 mg/100ml

No momento de usar, transfira 25 ml da solução estoque para um balão volumétrico de 100 ml e complete o volume com álcool absoluto.

Adicione ao tubo 4 ml da solução acima, agite durante 30 minutos após os quais os pedaços de papel, descorados, são retirados.

Para leituras espectrofotométricas convenientes, eluímos as manchas de três cromatogramas, correspondentes portanto a 60 μg da amostra e a 30 μg do padrão (procedemos de tal maneira porque não dispúnhamos de cubas cromatográficas maiores; a condição ideal seria colocar toda a amostra de uma só vez). O resultado final é a média de 3 leituras correspondendo a um total de 9 cromatogramas. As leituras são efetuadas no comprimento de onda de 570 $\text{m}\mu$.

As leituras em transmitância foram transformada em absorbância e o cálculo feito por meio da leitura do padrão.

RESULTADOS

Em todas as amostras analisadas foram identificados os seguintes aminoácidos: ácido glutâmico, alanina, lisina, histidina, triptofano, arginina, treonina e leucinas (fig. 2 a 10 e quadro I). Apenas em um produto composto contendo pequena quantidade de hidrolisado

de proteína de soja não foi detectada a presença de treonina. O teor de ácido glutâmico determinado em 5 amostras encontra-se reunido no quadro IV.

DISCUSSÃO

Naturalmente o processo empregado tem possibilidades limitadas, pois não identifica outros aminoácidos existentes na soja. Entretanto, como os hidrolisados não foram por nós preparados, mas sim manufaturados pelas indústrias, não sabemos até que ponto a hidrólise foi atingida ou se alguns dos aminoácidos existentes foram destruídos pelas condições do processo.

Na literatura consultada, comparando os nossos resultados com os encontrados por MIERZEJEWSKI & SKULMOWSKI⁹, que também pesquisaram aminoácidos em hidrolisados de proteína de soja por cromatografia em papel, observamos que os autores trabalharam com 3 pares de solventes. Com o 1º par (fenol-água 1:1 e piridina-butanol-água 25:45:40) identificaram serina, glicina, tirosina, alanina, arginina e triptofano; com o 2º par (butanol terciário-metiletilcetona-água 4:4:2 e butanol-metanol-água 4:5:1) identificaram alanina, triptofano, metionina, tirosina, valina, leucina e isoleucina; com um 3º par de solventes (fenol-água 7:3 e propanol-água 7:3) separaram e identificaram ácido aspártico, ácido glutâmico, histidina, treonina, prolina e alguns dos previamente citados, mas não separaram valina, metionina, leucina e isoleucina.

Verificamos assim que o par de solventes por nós empregado separa satisfatoriamente os aminoácidos existentes no hidrolisado de soja, embora tenha sensibilidade limitada, pois não conseguimos detectar metionina que é, segundo alguns autores, o aminoácido limitante da soja.

Entretanto, usando o mesmo par de solventes, trabalhando com 2 amostras de cabelo humano, cujo hidrolisado foi por nós preparado, conseguimos reproduzir 2 cromatogramas semelhantes, separando 12 aminoácidos (fig. 11 e 12).

QUADRO I

Aminoácidos de hidrolisados de proteína de soja

Ácido glutâmico	Leucinas
Alanina	Lisina
Arginina	Treonina
Histidina	Triptofano

Obtenção: hidrólise ácida

Identificação: cromatografia em papel

QUADRO II

*Aminoácidos de tortas de soja
(KUIKEN & LYMAN⁸)*

Ácido glutâmico	Lisina
Arginina	Metionina
Fenilalanina	Treonina
Histidina	Triptofano
Leucinas	Valina

Obtenção: hidrólise ácida

Identificação: método microbiológico

QUADRO III

*Aminoácidos de molho de soja
(TSUNODA et alii¹²)*

Ácido aspártico	Lisina
Ácido glutâmico	Metionina
Arginina	Prolina
Cistina	Serina
Fenilalanina	Tirosina
Glicina	Treonina
Histidina	Triptofano
Leucinas	Valina

Obtenção: hidrólise enzimática

Identificação: método microbiológico

QUADRO IV

*Teor de ácido glutâmico em hidrolisados
de proteínas de soja comerciais*

Amostra	Ácido glutâmico %	
	Declarado	Encontrado
a	5,5	6,2
b	7,1	8,3
c	7,5	8,2
d	17,8	16,5
e	4,3	4,4

Ainda na bibliografia consultada, no trabalho de KUIKEN & LYMAN⁸ encontramos os seguintes aminoácidos na composição da proteína de 20 variedades de soja (quadro II), obtida por hidrólise ácida e alcalina, determinados, porém, por métodos microbiológicos. Para molho de soja, obtido por hidrólise enzimática, no trabalho de TSUNODA et alii¹² foram encontrados e determinados por processo microbiológico 17 aminoácidos (quadro III).

A dosagem do ácido glutâmico foi efetuada nesses produtos comerciais com a finalidade de ser controlada a quantidade de monoglutamato de sódio neles declarados. Os melhores resultados para as leituras no espectrofotômetro foram obtidos usando-se a solução de sulfato de cobre em álcool em vez de eluir simplesmente com acetona ou álcool a 50% as manchas reveladas com ninhidrina.

O emprego de glutamato monossódico, como condimento em alimentos, foi estudado pelo COMITÊ MISTO FAO/OMS DE EXPERIMENTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIOS^{4,5}, na sua 13ª reunião, que discutiu o problema de sua avaliação como aditivo alimentar e chegou à conclusão de que poderia ser dada ao glutamato monossódico uma ingestão diária aceitável (IDA) de 120mg/kg para indivíduos em geral, exceção feita a crianças menores de um ano. Com a finalidade de verificar se está sendo ou não ultrapassada a ingestão diária aceitável, seria de interesse efetuar sempre a dosagem do glutamato monossódico em alimentos.

CONCLUSÃO

Nas condições em que trabalhamos, com o par de solventes utilizado conseguimos separar um número razoável de aminoácidos de hidrolisado de proteína de soja, comparando com os dados da literatura consultada.

O presente método, dentro de determinados limites, aplica-se a diferentes hidrolisados de proteínas.

Com relação ao ácido glutâmico, a separação foi bastante satisfatória em todos os cromatogramas; quanto ao seu doseamento, obtivemos valores que satisfizeram as nossas necessidades imediatas.

RESUMO

ALMEIDA, M.E.W. & SIMÃO, A.M. — Aminoácidos de hidrolisados de proteína de soja. Dosagem de ácido glutâmico. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 105-112, 1972.

Cromatografia bi-dimensional em papel foi aplicada com a finalidade de separar os diferentes aminoácidos de hidrolisado de proteína de soja.

Foi introduzido, com resultados satisfatórios, um novo artifício para identificação dos aminoácidos, e foram feitas algumas modificações na determinação do ácido glutâmico. As manchas correspondentes ao ácido glutâmico (padrão e amostra) foram recortadas, eluídas e o ácido glutâmico foi determinado por espectrofotometria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, M.E.W. — Aminoácidos livres em camarões. Variações decorridas durante a decomposição. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 15: 158-167, 1955.
2. ALTHOFF, J.D. — Nitrogen balance in a nutritional test with TVP (textured vegetable proteins). *Med. Klin.*, 65: 1204-07, 1970.
3. CIRCLE, S.J. & JOHNSON, D.W. — Edible isolated soybean protein. In: ALTSCHUL, A.M., ed. *Processed plant protein foodstuffs*. New York, Academic Press, 1958. p. 399.-418.
4. COMITÉ MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIOS. Ginebra, 1970. *Evaluación de los aditivos alimentarios*, 14º informe. Ginebra, 1971. (Org. Mund. Salud, Ser. Inf. Tecn., 462).
5. Ibid. 15º informe. Ginebra, 1972 (Org. Mund. Salud, Ser. Inf. Tecn. 488).
6. FOWDEN, L. — The quantitative recovery and colorimetric estimation of aminoacids separated by paper chromatography. *Biochem. J.*, 48: 327-333, 1951.
7. KENT-JONES, D.W. & AMOS, A.J. — Modern cereal chemistry. 4.ed., 2.impr. Liverpool, Northern Publishing, 1950. p. 110.
8. KUIKEN, K.A. & LYMAN, C.M. — Essential aminoacids composition of soybean meals prepared from twenty strains of soybeans. *J. Biol. Chem.*, 177: 29-36, 1949.
9. MIERZEJEWSKI, T. & SKULMOWSKI, J. — Detection and separation of aminoacids in protein hydrolyzates of soybeans by the paper chromatography method. *Annls Univ. Mariae Curie-Skolodowska* (Polonia), Sect. DD, 6: 309-324, 1951 apud *Chem. Abstr.*, 47: 7948d, 1953.
10. POLSON, A.; MOSLEY, V.M. & WYCKOFF, R.W.G. — The quantitative chromatography of silk hydrolysate. *Science*, 105: 603-604, 1947.
11. THOMPSON, J.F. & MORRIS, J.E. — Determination of aminoacids from plants by paper chromatography. *Analyt. Chem.*, 31: 103-139, 1959.
12. TSUNODA, T.; ISHIZUKA, Z.; MIYAZAWA, S. & TAMURA, G. — The microbiological determination of aminoacids in soy sauce. *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, 26: 477-480, 1952 apud *Chem. Abstr.*, 48: 14109e, 1954.

Recebido para publicação em 17 de agosto de 1972.

TEOR DE CÁLCIO, FERRO e FÓSFORO EM ALGUNS PEIXES BRASILEIROS DE ÁGUA DOCE (1)

CONTENTS OF CALCIUM, IRON AND PHOSPHORUS IN SOME BRAZILIAN FRESHWATER FISHES

LUÍŠ A. ARRUDA CAMARGO (2)
WILSON J. YASAKA (3)
SEIZI OGA (3)
KAZUE WAKI (4)

SUMMARY

CAMARGO, L.A.A.; YASAKA, W.J.; OGA, S. & WAKI, K. — Contents of calcium, iron and phosphorus in some Brazilian freshwater fishes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 113-117, 1972.

The contents of calcium, phosphorus and iron of the five freshwater fish species *Prochilodus scrofa* (corimbatá), *Leporinus copelândi* (piava), *Salminus maxillosus* (dourado), *Pimelodus clarias* (mandiúva) and *Leporinus piapara* (piapara) were determined.

The variation of the calcium concentration between the species studied was significant, the highest values being found in the piapara, corimbatá and dourado and the lowest values in the piava and mandiúva.

The contents of phosphorus equally varied according to the species, the dourado presenting the highest concentration and the piava the lowest.

The contents of iron was relatively constant, except for the piapara which presented a value significantly high.

In all the species analysed, the proportion between the components calcium and phosphorus were slightly inferior in respect to those usually accepted as standard.

The data obtained in comparison with those of the specialized literature suggest that the freshwater fishes are generally richer in minerals than the marine fishes.

INTRODUÇÃO

A utilização do pescado na alimentação humana aumenta cada vez mais, e isto se deve ao constante desenvolvimento da técnica pesqueira e à divulgação dos conhecimentos científicos sobre o valor nutritivo dos peixes ¹³.

Os minerais, principalmente o cálcio, o ferro e o fósforo, desempenham importantes funções no organismo, participando tanto na for-

mação de diversas estruturas como em muitas funções metabólicas ¹⁵, sendo por isso de grande valia a determinação de seus teores em alimentos.

Os peixes em geral são tidos como uma das principais fontes destes minerais. Sob este aspecto os peixes marinhos são os mais conhecidos, havendo relativamente poucos dados referentes aos peixes brasileiros de água doce.

Frente a esses conhecimentos, foram anali-

(1) Realizado no Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P. e no Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara.

(2) Do Departamento de Ciências Fisiológicas da F.F.O.A.

(3) Do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do I.C.B.U.S.P.

(4) Do Laboratório I de Baurú, S.P., do Instituto Adolfo Lutz.

sados os teores de cálcio, ferro e fósforo em algumas espécies de peixes de água doce, complementando o estudo recentemente efetuado com as mesmas espécies³.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

- Ácido 1,2,4-amino naftolsulfônico p.a. (1)
- Ácido clorídrico p.a. (1)
- Ácido sulfúrico p.a. (1)
- Ferro metálico p.a. (2)
- Fosfato tripotássio p.a. (2)
- M-bissulfito de sódio p.a. (2)
- Molibdato de amônio p.a. (3)
- Oxalato de amônio p.a. (2)
- Peridrol p.a. (2)
- Permanganato de potássio p.a. (2)
- Sulfito de sódio p.a. (2)
- Tiocianato de potássio p.a. (2)

Peixes utilizados

Utilizaram-se 50 peixes, sendo 10 de cada espécie, colhidos no rio Mogi-Guaçu, na região compreendida entre os municípios de Rincão e de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, no período de junho a outubro.

QUADRO I

Espécies utilizadas e respectivos pesos médios

Espécies	Peso em gramas	
	Média	D.P. (\pm)
<i>Leporinus copelandi</i> (piava)	700	50
<i>Salminus maxillosus</i> (dourado)	3.500	200
<i>Pimelodus clarias</i> (mandiúva)	550	40
<i>Prochilodus scrofa</i> (corimbatá)	2.300	150
<i>Leporinus piapara</i> (piapara)	1.800	200

D.P. – Desvio padrão.

As espécies analisadas foram: *Leporinus copelandi* (piava), *Salminus maxillosus* (dourado), *Pimelodus clarias* (mandiúva), *Prochilodus scrofa* (corimbatá) e *Leporinus piapara* (piapara), com pesos variáveis de 700 g a 3.500g conforme as espécies (QUADRO I).

Todos os animais foram trazidos vivos ao laboratório e sacrificados alguns minutos antes da experiência.

Métodos empregados

A análise dos minerais foi efetuada utilizando a “farinha” de peixe preparada a partir de “filés” homogeneizados, desidratados e desengordurados, segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz^{8,9}.

Cinza (minerais totais) – A “farinha” foi pesada em cadinhos de porcelana previamente aquecidos, e colocada na mufla (550°C) até peso constante¹⁰.

Fósforo – O fósforo foi determinado colorimetricamente de acordo com a técnica de HAWK *et alii*⁷.

Cálcio – O cálcio foi determinado pelo método de permanganometria preconizado pela Association of Official Agricultural Chemists¹.

Ferro – O ferro foi dosado segundo o método de CRAMER *et alii*⁵ baseado na coloração vermelha desenvolvida com a solução de tiocianato de potássio.

RESULTADOS

Cinza (minerais totais)

Os valores médios (\pm D.P.) do teor de cinza expresso em grama por 100 gramas do material íntegro apresentaram uma variação significativa, conforme as espécies:

(1) Carlo Erba
(2) Merck
(3) Riedel

QUADRO II

Teor de cinza em g/100g do material íntegro, nas espécies analisadas. Cada valor representa a média (\pm D.P.) obtida de 10 animais

Peixes	Cinzas (minerais totais) g/100 g	
	Média	D.P. (\pm)
Piapara	1,126	0,077 *
Dourado	1,081	0,067
Piava	1,034	0,020
Corimbatá	1,023	0,089
Mandiúva	0,877	0,034 *

* Valores extremos com diferença significativa
P < 0,01

O maior valor foi constatado na piapara com $1,126 \pm 0,077$ e o menor, com a mandiúva com $0,877 \pm 0,034$. Valores intermediários apresentaram o dourado ($1,081 \pm 0,067$), o corimbatá ($1,023 \pm 0,089$) e a piava ($1,034 \pm 0,020$).

Cálcio

Os teores de cálcio, expressos em mg/100 g do material íntegro, foram relativamente altos para a piapara, com $113,928 \pm 5,330$; o corimbatá, com $108,338 \pm 6,120$ e o dourado, com $105,075 \pm 9,170$ e menores para a piava e a mandiúva, com $96,371 \pm 5,060$ e $85,046 \pm 4,780$, respectivamente:

QUADRO III

Teor de cálcio em mg/100g do material íntegro nas espécies analisadas. Cada valor representa a média (\pm D.P.) obtida de 10 animais

Peixes	Cálcio mg/100 g	
	Média	D.P. (\pm)
Piapara	113,928	5,330
Corimbatá	108,338	6,120
Dourado	105,075	9,170
Piava	96,371	5,060
Mandiúva	85,046	4,780

Fósforo

Os valores de fósforo, em mg/100g do material íntegro, foram: $498,830 \pm 45,060$ para o dourado, $476,305 \pm 16,230$ para a mandiúva,

$434,424 \pm 32,220$ para o corimbatá, $386,668 \pm 35,560$ para a piapara e $334,406 \pm 8,360$ para a piava:

QUADRO IV

Teor de fósforo em mg/100g do material íntegro nas espécies analisadas. Cada valor representa a média (\pm D.P.) obtida de 10 animais

Peixes	Fósforo mg/100 g	
	Média	D.P. (\pm)
Dourado	498,830	45,060
Mandiúva	476,305	16,230
Corimbatá	434,424	32,220
Piapara	386,668	35,560
Piava	344,406	8,360

Ferro

A quantidade de ferro, expressa igualmente em mg/10 g do material íntegro, foi: $2,200 \pm 0,210$; $1,490 \pm 0,190$; $1,483 \pm 0,074$; $1,400 \pm 0,083$ e $1,364 \pm 0,154$, respectivamente para piapara, piava, corimbatá, mandiúva e dourado:

QUADRO V

Teor de ferro em mg/100g do material íntegro nas espécies analisadas. Cada valor representa a média (\pm D.P.) obtida de 10 animais

Peixes	Ferro mg/100 g	
	Média	D.P. (\pm)
Piapara	2,200	0,210
Piava	1,490	0,190
Corimbatá	1,483	0,074
Mandiúva	1,400	0,083
Dourado	1,364	0,154

DISCUSSÃO

A carência de dados no que tange a teores de minerais em peixes de água doce torna difícil a comparação de dados obtidos.

Em contraste, todavia, os peixes marinhos são largamente estudados, sendo conhecidos os teores de minerais de diversas espécies.

WULEUNG & FLORES¹⁶ citam valores de cálcio que variam de 10 mg/100g do material íntegro para o bacalhau até 216 mg/100 g para o salmão. ITO & WATANABE¹¹, trabalhando com peixes marinhos brasileiros, encontraram para a corvina e a pescada-foguete os teores de cálcio de 41,5 e 19,2 mg/100 g, respectivamente.

Os valores obtidos no presente trabalho para o cálcio variaram de 85,046 mg/100 g para mandiúva até 113,928 mg/100 g para piapara. As espécies estudadas, portanto, apresentam concentração altamente satisfatória de cálcio, quando comparada com a dos peixes marinhos.

Quanto ao fósforo, em peixes marinhos, os valores variam desde 58 mg/100 g para o cação até 200 mg/100g para o atum⁶, encontrando-se valores intermediários para o bacalhau¹⁴ (194 mg/100g), a pescada-foguete (155 mg/100g) e a corvina¹¹ (196 mg/100g).

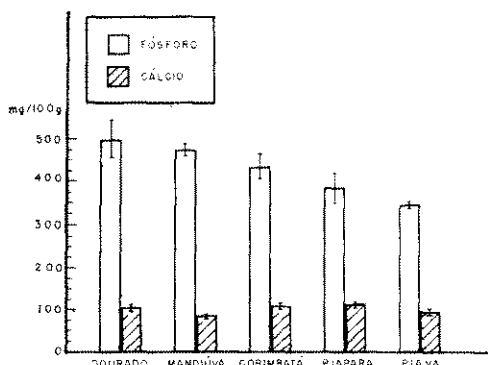
Nas espécies analisadas, a variação foi de 344,406 mg/100g (piava) a 498,830 mg/100g (dourado), valores, aliás, bastante semelhantes ao valor da tilápia (516,075 mg/100g) obtido por CAMARGO & BELDA NETO² e do acará¹² (364,700 mg/100g).

Quanto ao teor de ferro, são encontrados valores como 0,8 mg/100 g (atum)⁶, 0,3 mg/100 g (bacalhau)⁶, 0,4 mg/100 g (cação)⁶, 1,7 mg/100g (corvina)¹¹ e 1,2 mg/100 g (pescada)¹¹.

Os valores obtidos com as espécies em estudo são ligeiramente superiores, onde o menor valor foi 1,3 mg/100g (mandiúva) e o maior de 2,2 mg/100g (piapara).

Esses dados demonstram que, de modo geral, o teor de minerais, sobretudo do fósforo, dos peixes de água doce é superior ao teor dos peixes do mar, embora tal afirmação não possa ser generalizada para todas as espécies.

Por outro lado, a relação entre o cálcio e o fósforo (Ca:P) nas espécies analisadas foi ligeiramente inferior àquela aceita como normal⁴ que variou de 1:2 a 2:1, conforme o gráfico:



Teor do fósforo e do cálcio, em mg/100g do material íntegro, nas espécies analisadas.

RESUMO

CAMARGO, L.A.A.; YASAKA, W.J.; OGA, S. & WAKI, K. - Teor de cálcio, ferro e fósforo em alguns peixes brasileiros de água doce. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 113-117, 1972.

Determinaram-se os teores de cálcio, fósforo e ferro nas cinco espécies de água doce: *Prochilodus scrofa* (corimbatá), *Leporinus copei* (piaba), *Salminus maxillosus* (dourado), *Pimelodus clarias* (mandiúva), e *Leporinus piapara* (piapara).

A variação da concentração de cálcio entre as espécies foi significativa, tendo se constatado maiores valores na piapara, corimbatá e dourado e menores na piava e mandiúva.

O teor de fósforo igualmente variou conforme as espécies, tendo o dourado apresentado a maior concentração e a piava a menor.

O teor de ferro foi relativamente constante, com exceção da piapara, que apresentou valor significativamente elevado.

Nas espécies analisadas, as proporções entre os elementos cálcio e fósforo (Ca:P) foram ligeiramente inferiores em relação àquelas normalmente aceitas como padrão.

Os dados obtidos, em confronto com os da literatura, sugerem que os peixes de água doce são, de modo geral, mais ricos em minerais do que os peixes marinhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS – *Official methods of analysis*. Washington, A.O.A.C., 1965. p.96–97.
2. CAMARGO, L.A.A. & BELDA NETO, F.M. – Aspectos químico-bromatológicos da *Tilapia melanopleura*, Duméril, 1859. *Rev. Fac. Farm. Odont. Araraquara*, 3(2): 259–265, 1969.
3. CAMARGO, L.A.A.; YASAKA, W.J. & OGA, S. – Constantes físicas e químicas dos extratos etéreos de alguns peixes brasileiros. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 1972. [No prelo].
4. CANTAROW, A. & SHEPARTZ, B. – *Bioquímica*. 3a. ed. Guanabara, Atheneu, 1968. p.675–676.
5. CRAMER, E.R.; PINHO, G.D. & MOTA, S. – Teor mineral de alguns alimentos brasileiros: Subsídios para uma tabela nacional. Memória III. *Rev. Nutr.*, 1: 83–93, 1950.
6. FERREIRA, F.A.G. & GRAÇA, M.E.S. – *Tabela da composição dos alimentos portugueses*. Lisboa, Inst. Sup. Hig. Dr. Ricardo Jorge, 1961. p. 42–49.
7. HAWK, P.B. OSER, B.L. & SUMMERSON, W. H. – *Practical physiological Chemistry*. 12thed. Philadelphia, Blakiston, c1947. p. 953.
8. INSTITUTO ADOLFO LUTZ – *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. São Paulo, Inst. Adolfo Lutz, 1967. v. 1, p.12–13.
9. Ibid. p. 30–31.
10. Ibid. p. 17–19.
11. ITO, Y. & WATANABE, K. – Variations in chemical composition in the fillet of corvina and pescada-foguete. *Contribções Inst. Oceanogr. Univ. S. Paulo*, Ser. *Tecnologia*, 5: 1–6, 1968.
12. JORGE, F.B. – *Contribuição ao estudo da composição química dos alimentos de consumo habitual no Estado de São Paulo: sódio, potássio, cálcio e fósforo*. São Paulo, 1961. P. 30. [Tese-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].
13. LUDORFF, W. – *El pescado y sus productos*. Trad. do alemão de Maria Dolores Sacristan. Zagarozza, Acirbia, [1963].
14. MONTES, A.L. – *Bromatologia*. Buenos Aires, Universitária, 1966. p. 274–275.
15. WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, F.L. – *Principles of biochemistry*. 3thed. Japan, Kogakusha, 1964. p. 777.
16. WULEUNG, W.T. & FLORES, M. – *Tabla de composition de alimentos para uso en America Latina*. Bethesda, INCAP, 1961. p. 131.

Recebido para publicação em 12 de setembro de 1972.

