

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Abril - 1976

INCIDÊNCIA DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS
EM ALIMENTOS, UM SURTO DE INTOXICAÇÃO
E EVIDENCIAÇÃO DA PROVA DE LECITINASE

Por

Antônio de Melo SERRANO

Tese de doutoramento, apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

AO

PROF.

DR. IHIEL SCHWARTZ SCHNEIDER

À MEMÓRIA DE MEUS PAIS

Este é o produto da ajuda e compreensão do

- PROF. DR. IHIEL SCHWARTZ SCHNEIDER, o orientador lúcido, dedicado e incansável, desde os nossos primeiros passos;
- PROF. DR. ANDRÉ TOSELLO, que nos facilitou os meios de realização desta pesquisa;
- PROF. DR. AQUILES E. PIEDRABUENA, autoridade em Estatística, que fez a análise dos dados;
- PROF. DR. JORGE LEME JUNIOR, que, quando chefe do Departamento de Tecnologia, nos incentivou e propiciou meios para a pesquisa;
- PROF. DR. FUMIO YOKOYA, que nos liberou totalmente o seu laboratório;
- DR. MAURO FABER FREITAS LEITÃO, em cujo laboratório e companhia iniciamos os estudos preliminares;
- DR. OSCAR DONATO RADOMILLE, Secretário Municipal de Saúde e
- DR. GUSTAVO ADOLPHO DE SOUZA MURGEL, Diretor de Saúde, da Prefeitura Municipal de Campinas, que, durante longo tempo, nos concederam todas as facilidades para a coleta de amostras;
- DR. JOSÉ BENÍCIO NUNES DE MIRANDA, Chefe da Patologia Clínica do Instituto Adolfo Lutz, que, durante anos, nos forneceu sangue de ovino para as experiências;
- PROF. DR. JOSÉ CHRISTOVAM SANTOS, a quem devemos ponderadas observações;
- SRTA. ANA LOURDES NEVES GANDARA, dedicada Técnica de Laboratório, que, desde 1975, nos ajudou com seriedade no trabalho;
- PROF. DR. FREDERICK C. STRONG III, que laborou a tradução inglesa do resumo do trabalho;

também da minha família e amigos, que, por acreditarem em mim, me estimularam a procurar mais e melhor.

A todos,
obrigado.

ÍNDICE

	Página
RESUMO EM PORTUGUÊS.	1
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. OBJETIVO DESTES TRABALHOS DENTRO DA SITUAÇÃO HISTÓRICA	3
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
1.2.1. Morfologia do <u>Clostridium perfringens</u> e caracteres das colônias	9
1.2.2. Esporulação e resistência ao calor	11
1.2.3. Reação de Nagler	14
1.2.4. Atividade da lipase.	16
1.2.5. Mecanismo da ação do germe	17
1.2.6. Reações sacarolíticas e proteolíticas.	21
1.2.7. Sorologia.	23
1.2.8. Características do crescimento	24
1.2.8.1. Temperatura	24
1.2.8.2. pH.	26
1.2.8.3. Ácidos aminados e vitaminas	27
1.2.8.4. Alimentos	29
1.2.8.5. Sais e outras substâncias	32
1.2.9. Habitat.	35
1.2.9.1. Fezes	35
1.2.9.2. Solos, poeiras e moscas	39
1.2.9.3. Alimentos	40

1.2.10. Isolamento.	48
1.2.10.1. Tratamento das amostras	48
1.2.10.2. Meios de isolamento e de enriqueci mento	50
1.2.10.3. Meios de confirmação.	57
1.2.10.4. Incubação	61
1.2.11. Os Surtos	64
1.2.11.1. Preparação dos alimentos.	64
1.2.11.2. Prevenção	71
2. MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1. MATERIAL.	75
2.2. MÉTODOS	79
2.2.1. Para exame dos alimentos.	79
2.2.2. Para exame do surto	82
2.2.3. Para avaliação da nova modificação do meio de WILLIS & HOBBS.	83
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.1. DO EXAME DOS ALIMENTOS.	85
3.2. DO ESTUDO DO SURTO DE INTOXICAÇÃO ALIMENTAR	110
3.3. DA AVALIAÇÃO DA NOVA MODIFICAÇÃO DO MEIO DE WILLIS & HOBBS	124
4. CONCLUSÕES	136
TÍTULO E RESUMO EM INGLÊS	140
ANEXOS	142
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145

...ooo0ooo...

RESUMO

1. Para se pesquisar a ocorrência de C. perfringens em produtos alimentares vendidos em Campinas, São Paulo, foram examinadas 50 amostras de carne moída de bovino, obtidas de máquinas moedoras de açougues, 50 amostras de carne de suíno, em pedaços, 50 amostras de corvina, 50 de frango já cortado em pedaços, 35 amostras de lingüiça fresca, 31 de salsicha e 31 de coxinha de galinha, todas obtidas em diversos retalhistas, com exceção da corvina, colhida em atacadista.

As amostras, após homogeneização, foram isoladas em placas com ágar-sangue e a confirmação do microrganismo foi feita no meio de WILLIS & HOBBS (1958).

Para a pesquisa do C. perfringens em carne bovina, suína, frango e corvina, foram usados três procedimentos: num, o homogeneizado foi semeado diretamente em ágar-sangue; noutro, a mesma semeadura foi feita depois de um aquecimento a 80°C, por 10 min; e, num terceiro, o homogeneizado foi inoculado em caldo de carne cozida, aquecido em banho-maria fervente, por 60 min., incubado e depois inoculado em ágar-sangue. A frequência média de amostras positivas de carne bovina, nesses meios, foi de 10%, 2% e 4%, respectivamente; de carne suína, foi de 20%, 0% e 6%; 15%, 0% e 2%, para frango; e 4%, 0% e 0%, para corvina.

Para a mesma pesquisa em salsicha, lingüiça e coxinha, foram usados apenas dois procedimentos: num, homogeneizados idênticos de salsichas foram inoculados diretamente em placas; e, noutro, enriqueciam-se primeiro os homogeneizados em caldo de carne cozida e depois inoculava-se esta em ágar-sangue. A frequência de amostras

positivas foi de 3% e 6%, respectivamente. Idênticos procedimentos em lingüiça evidenciaram 6 e 60%; e 3% e 6%, em coxinhas.

No exame de 120 estufas e posteriormente de 118, que manti_u nham produtos para pronto consumo, encontramos, respectivamente, 38,6% e 49,5% com temperaturas entre 30º e 48ºC, condição esta fa_z vorável ao desenvolvimento de C. perfringens.

2. Tendo ocorrido uma intoxicação alimentar num refeitório, foi distribuído um questionário a parte de 2.016 pessoas que toma_u ram a refeição. O inquêrito revelou que 88,2% das pessoas tiveram diarréia; 74,2%, dores abdominais; 16,1%, tonturas; 14%, prostra_ç ão; 9,7%, náuseas; 8,6%, vômitos; 6,5%, febre. A mediana do tempo de incubação foi de 13 horas. A duração dos sintomas foi de menos de 24 horas, em quase todos os doentes. A contagem de C. perfrin_gens nas fezes dos doentes foi maior do que a das pessoas normais. O alimento mais suspeito de ter causado a intoxicação foi uma maio_u nese, cujos principais componentes eram corvina e batata.

3. Em face das dificuldades na evidenciação da lecitinase, através dos processos até hoje descritos, procuramos obter um novo meio. No presente estudo, foram comparadas quatro culturas de C. perfringens: no meio de WILLIS & HOBBS (1958); no mesmo, modifica_ç do por HALL et al. (1969); e no meio de WILLIS & HOBBS, por nós mo_o dificado. Só neste último as quatro culturas mostraram a reação de lecitinase, de forma clara, indubitável e em apenas 24 horas.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O OBJETIVO DESTE TRABALHO DENTRO DA SITUAÇÃO HISTÓRICA

Muito embora o agente da gangrena gasosa já tivesse sido des coberto, somente em 1895, pela primeira vez, foi relacionado a uma doença caracterizada por dores abdominais, diarréia e vômitos pouco comuns. KLEIN, que descreveu dois casos destas doenças, aparecidas num hospital, isolou nas fezes dos pacientes o microrganismo (apud 81).

Em 1899, ANDREW (6), no seu trabalho, cita três surtos de diarréias epidêmicas de curta duração, que apareciam de noite, sem forma alarmante na maioria dos casos, quase sempre sem vômitos, mas, em alguns casos, com muco e até sangue nas fezes. Achou que a ocorrência era "provavelmente causada por infecção por pudim de arroz feito de leite portador de Bacillus enteritides sporogenes". Esse germe, que ANDREW examinou, juntamente com KLEIN, nas fezes e no leite que chegava ao hospital, era anaeróbio esporulado. Tomando a temperatura a que era submetido o leite na cozinha, verificou que a média era de 90 a 92°C e nunca excedia 98°C, o que o levou a concluir que, sendo os esporos resistentes ao calor de 100°C, poderiam resistir ao aquecimento e passar para a alimentação das pessoas, sem serem destruídos. E considerava ainda que, existindo como saprófito, a cocção do leite podia eliminar os outros concorrentes ou ainda conferir a este microrganismo um poder tóxico. Mas isso, afirmava, era "um grande e promissor campo para futuras pesquisas".

Em 1943, KNOX & MACDONALD (93) relataram que um molho de carne

provocou diarréias e vômitos em pessoas, duas horas depois de almoçarem ou ao fim da tarde. O molho tinha sido preparado de véspera e deixado na geladeira, em recipientes de dois galões e "o mais espantoso" era que a sua temperatura só tinha baixado a 25,5°C no refrigerador. Constatou também que o molho continha 30 a 50 milhões de Clostridia por centímetro cúbico e não tinha aeróbios. Os Clostridia que este autor isolou não eram sempre os mesmos, mas em dois casos existia o Clostridium welchii, sendo uma das estirpes toxígena e a outra não.

Fora da Inglaterra, McCLUNG, nos Estados Unidos da América do Norte, em 1945, descreveu quatro surtos de intoxicação alimentar com a mesma sintomatologia dos da Inglaterra, ocorridos depois da ingestão de frangos com molho, preparados de véspera. Neste, sempre encontrou um microrganismo que mostrava as reações do Clostridium perfringens. Embora o trabalho não merecesse a devida atenção na época, anotou este autor o que hoje é tido como muito importante, isto é, que os surtos pareciam ser eliminados com cuidados de limpeza da cozinha e com a fervura do molho antes da ingestão. McCLUNG não conseguiu demonstrar a produção de toxina em ratos e cobaias e concluía que o fato de aparecerem os citados microrganismos nos alimentos não significava necessariamente que fossem os causadores da doença, porque eles eram ubíquos (107).

Todos estes casos, em regra não mortais, incluem-se hoje no tipo A do Clostridium perfringens, mas, na Alemanha, de 1947 a 1949, apareceram casos mais graves, caracterizados por enterites hemorrágicas e algumas mortes, outras vezes são diarréias acompanhadas de dores abdominais. Nestes casos foi isolado o Clostridium perfringens das fezes e das lesões intestinais, o qual, mais tarde,

veio a ser colocado como tipo F e depois como C (79, 81, 163). Casos semelhantes, relacionados com a ingestão de carne de porcos pelos indígenas de Papua, Nova-Guiné, em 1966, também foram incluídos no tipo C do Clostridium perfringens (117, 118), como o foram casos da Austrália e Uganda, também em 1966 (71).

Em 1953, estabeleceu-se um marco científico no estudo de que nos ocupamos, quando apareceu o trabalho fundamental de BETTY C. HOBBS com mais quatro colaboradores (81). Apresentavam surtos da Inglaterra e País de Gales, aparecidos entre 1949 e 1953. Os autores apontaram valores das contaminações em alimentos e em fezes de pessoas normais e doentes, fontes da infecção, morfologia das colônias e do microrganismo, experimentos em homens, modo de infecção, a toxicologia e a sorologia, o que tornou indubitável a etiologia da doença. O microrganismo, devido à fraca potência de toxina, α , às falhas de produção de toxina teta e à produção variável de hialuronidase, levou-os a incluí-lo no tipo A de Clostridium perfringens, onde ainda hoje permanece, apesar da termorresistência que apresenta.

Em 1959, MCKILLOP, em Glasgow, apresentou casos de intoxicação provocados por ingestão de frangos pré-cozidos, em que o Clostridium perfringens era hemolítico β e termossensível (107).

Em 1963, HALL et al. (59) concluíram que muitos microrganismos isolados de taxi-infecções alimentares, nos Estados Unidos, eram Clostridium perfringens sensíveis ao calor, pertencentes ao tipo A clássico (59, 92). SUTTON & B. HOBBS também comprovaram a existência dessas estirpes na Grã-Bretanha, em 1966 e 1967 (168), e na mesma altura a mesma observação foi feita no Canadá (75).

Se bem que houvesse comunicações epidemiológicas oficiais so

bre o C. perfringens desde 1959, nos Estados Unidos, ainda em 1962 se lamentava que, fora da Grã-Bretanha, pouco interesse se tivesse devotado até então ao microrganismo, por ser anaeróbio de difícil estudo, por falta de meios adequados de isolamento e também porque só poucos laboratórios se dedicavam ao seu estudo. Isso fazia com que surtos com sintomas que inculpavam o C. perfringens não fossem identificados como tais (7). De apenas quatro surtos registrados em 1959, passou-se a 29 em 1967 e 56 em 1968, com 5.966 casos e 15.698 pessoas em risco (35). Nesse ano de 1968, num banquete oferecido a 1.800 pessoas, 560 adoeceram por essa causa. A situação começava a esclarecer-se: diminuía o número de casos de etiologia desconhecida, os quais eram ocupados, então, pelo C. perfringens; este, de terceiro ou quarto microrganismo em importância, passava para segundo em surtos, em 1968, mas primeiro em número de casos (49,4%) (35). Em 1970, nos Estados Unidos, 29,7% dos casos de toxi-infecções alimentares foram atribuídos ao C. perfringens, 20,4% a Salmonella e 19,8% a Staphylococcus (28).

Na Inglaterra, desde a década de 50, já se sabia que o germe era o grande responsável por toxi-infecções alimentares e, em 1968, foram notificados 56 surtos, envolvendo 6.000 pessoas (165). Já se observara, em 1963, que o número de casos ultrapassava aqueles ocasionados por Salmonella, que era, até então, o primeiro (78). Em 1970, na Inglaterra e País de Gales, eram notificados 32 surtos, envolvendo 1.263 pessoas, estando o C. perfringens, nesse ano, classificado em segundo lugar, depois da Salmonella (80).

Na Inglaterra e País de Gales, muito embora haja 62 laboratórios pertencentes aos "Public Health Laboratory Service" e existam laboratórios nas próprias indústrias, não havia, até 1973, padrões

microbiológicos para C. perfringens. Seu número, todavia, como o de Escherichia coli, era considerado importante, sendo os vários resultados obtidos através do tempo comparados, para comprovação da eficácia dos processos de limpeza aplicados à indústria de alimentos (80).

Nos Estados Unidos, porém, o Estado de Oregon estabeleceu padrões para contagem global e de E. coli e impôs os testes para C. perfringens, embora não fixasse padrões para este microrganismo (136).

No mesmo país, para refeições usadas em viagens estratosféricas, em consequência da diminuição da convecção e condução e da fonte de calor ser de 69,4°C, os alimentos são elaborados cuidadosamente; dos estudos sobre tempo de geração, limitou-se o número de C. perfringens a 100/g, dado que os alimentos ou são desidratados ou congelados e ficam aquecidos à temperatura da multiplicação do microrganismo, no máximo duas horas, antes de serem consumidos (15).

Em 1975, o Canadá estava elaborando uma lei com padrões para carne moída e será um dos primeiros países a possuírem tal regulamentação. Para carne bovina moída e não congelada, prevêem-se no máximo 10.000.000 de microrganismos p/g, 100/g de E. coli, 100/g de Staphylococcus coagulase positivos e 0 de Salmonella (47).

Entre nós, no Estado de São Paulo, o Decreto nº 52.504 de 28 de julho de 1970, em NTAl, estabelece: "a carne exposta à venda como carne crua, preparada ou moída, não deverá conter Micrococcus pyogenes variedade aureus em 0,1 g; Proteus em 0,01; Escherichia coli em 0,001; Streptococcus faecalis em 0,001; Clostridium sulfito-redutor em 1g; número total de bactérias vivas mesófilas aeró

bias saprófitas no máximo 500.000 por lg".

No Brasil, no entanto, não conhecíamos qualquer estudo ou publicação a respeito do C. perfringens como agente de toxi-infecções alimentares, até 1971. Por isso, nesse ano, iniciamos nosso trabalho, com o intuito de avaliarmos se ocorria a contaminação de alguns produtos habituais da alimentação, bem como tentarmos obter quaisquer outras informações adicionais, que pudessem situar o problema entre nós.

Considerando as dificuldades de importação, procuramos montar um laboratório, o máximo possível com recursos nacionais, mesmo sendo necessário adaptar ou criar aparelhos, embora tendo em vista que a primeira elaboração dum equipamento é muitas vezes deficiente e a testagem pode levar a modificações demoradas. A compensação desse trabalho seria a de podermos, no futuro, oferecer meios fáceis, acessíveis e imediatos para a pesquisa em institutos e indústrias não tão bem aparelhadas.

Os primeiros isolamentos foram feitos em 1971 e o acerto da montagem dos aparelhos e o estudo das reações foram feitos sobre 275 amostras de alimentos (carne de vaca, boi, frango, salsichas, coxinhas de galinha, croquetes, lingüiças, quibes, "esfiha", mortadela, sardinha) e fezes humanas. A este número de amostras devem adicionar-se múltiplas repicagens e testes de evidenciação da prova de lecitinase, melhora das condições de anaerobiose, a inesperada inibição de desenvolvimento por uma neomicina que nos forneceram e o controle das quantidades de amostra a homogeneizar.

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. Morfologia do Clostridium perfringens e caracteres das colônias

O Clostridium perfringens (VEILLON & ZUBER) HAUDUROY et al. (20) é um bacilo de extremidades arredondadas (17, 187) ou aguçada (31), reto, de 0,9 a 1,3 por 3 a 9 micra, podendo, em meios convenientes, como o caldo de carne cozida contendo 10% de sangue integral, produzir uma cápsula bem evidente (21, 77, 187). É gram positivo, imóvel e os esporos são subterminais, raras vezes situados no centro do bastonete. Não são muito incomuns formas vegetativas em filamentos longos, formas cocôides pequenas e às vezes asociadas, formas de bacilos alongados e cheios, mal corados, todas podendo aparecer em fase de esporulação (81).

Em ágar-sangue, as colônias são geralmente circulares, inteiras, lisas e poucas vezes rugosas, às vezes umbilicadas com periféria chata, mostrando estriações radiais, sem tendência a espalhar-se; as formas translúcidas são não esporuladas, mas ocorrem formas opacas que são esporuladas; o tamanho das colônias varia entre 2 a 5 mm, podendo ser menores (26, 42, 76, 77, 81, 83, 187). As colônias rugosas apresentam-se às vezes com limites qual folha da parreira (31).

As colônias diferentes apresentam diferenças sorológicas e as semelhantes têm comportamentos sorológicos iguais (60).

Os trabalhos iniciais só mencionavam estirpes não hemolíticas e que podiam, depois de alguns dias, apresentar pálida hemólise em sangue de cavalo. Com a descoberta de que as estirpes termolábeis

também eram causa da doença, a situação foi revista em 1968 e o tipo A de C. perfringens foi dividido em: 1) estirpes clássicas, hemolíticas β em ágar-sangue de cavalo, que formam esporos raramente resistentes a 100°C por mais de 10 minutos; 2) estirpes não hemolíticas, resistentes a 100°C, por mais de uma hora, quando em caldo de carne cozida, e que são produtoras de traços de lecitinase; 3) estirpes sensíveis ao calor, não hemolíticas, produtoras de quantidades variáveis de lecitinase (82).

Há, contudo, muitos casos de sobreposição entre as três categorias e há registro de casos excepcionais, dos quais se resumem alguns: colônias hemolíticas β , asporuladas, deram colônias hemolíticas β esporuladas, com a forma de ovo estalado, e os esporos, aparecidos em ágar-sangue, mantiveram-se por várias culturas; estirpe hemolítica β e resistente ao calor produziu em subculturas colônias hemolíticas β , lisas e não esporuladas e também deu outras não hemolíticas e hemolíticas, esporuladas, variáveis em tamanho, forma e textura; e um simples esporo produziu cinco tipos diferentes de colônias (82).

Os efeitos hemolíticos em ágar-sangue não são perfeitamente consistentes e podem variar com as sucessivas produções do meio (25); e, mesmo, se esses efeitos não aparecem no primeiro dia, podem tornar-se visíveis, se se deixarem as placas à temperatura ambiente mais ou menos por quatro horas, depois de saírem da incubação em anaerobiose (59). Também podem as colônias não ser hemolíticas no primeiro isolamento e virem a sê-lo nas repicagens subsequentes (81). Também se têm observado estirpes isoladas de alimentos que produzem menos quantidade de lecitinase e são menos hemolíticas do que as que provêm de fezes ou solo (148). Este polimor

fismo de comportamento deste gênero torna seu estudo mais difícil e menos atraente para alguns pesquisadores.

1.2.2. Esporulação e Resistência ao Calor

Duma forma geral, a esporulação é difícil de se obter em laboratório e, para se conseguir, necessitam-se meios especiais. Espontaneamente é difícil de se obter, embora haja excepcionais que a possam produzir. Um meio de esporulação muito usado é o de ELLNER (43). Este meio dá pequena porcentagem de esporos e os que se obtêm podem ser atípicos e diferentes dos esporos produzidos em outros meios (163). A melhor temperatura da esporulação é entre 37 a 40°C, sendo que abaixo de 32°C ou acima de 40°C só algumas estirpes esporulam (130). Os meios de KIM et al. (91) e o SEC (7) (vide quadro V, p.52) são inferiores, embora este permita obter uma boa porcentagem de esporos resistentes ao calor (41). Porém, o melhor meio conhecido até esta data é o de DUNCAN & STRONG* (41). Os resultados com este meio podem ser melhorados, sobretudo para estirpes sensíveis ao calor, se se realizar um aquecimento prévio à germinação (a produção de esporos no meio aquecido e não aquecido guarda a proporção de 2.000 para 1) e, ainda, se se substituir a peptona por proteose-peptona (1).

A esporulação no intestino realiza-se facilmente e nas fezes a porcentagem de esporos, entre as células, é muito variável, podendo ir de 0,04 até 100%, sendo aquelas formas de resistência quase ausentes numa dieta de Lactobacillus acidophilus, leite e lactose (25).

* Comunicação pessoal de H. Riemann

Desde os estudos de HOBBS, B.C. et al., em 1953, vem sendo repedido que a esporulação não se dá em alimentos cárneos. Todavia, em 1972, conseguiram-se altos níveis de C. perfringens esporulados em carne bovina assada, carne moída com molho cremoso, peru e sobretudo em hamburgos, que, depois de cozinhados e inoculados com formas vegetativas, foram colocados a vácuo, em sacos de polietileno laminado, com baixa permeabilidade ao oxigênio e incubados a 25°C ou 46°C ou, de preferência, a 37°C (34). As estirpes resistentes ao calor são menos comuns que as termossensíveis, embora estas não se encontrem nos primeiros trabalhos, devido não só ao fato de serem mais facilmente destruídas nos processos culinários, mas, sobretudo, porque as técnicas então usadas não as detectavam. A sensibilidade ao calor destas últimas pode não ser grande e as estirpes apresentarem D_{80} na carne igual a 60 - 200 min (168); mas, entre as resistentes, há as que suportam muito mais calor, como foi o caso de uma isolada por HOBBS, B.C. et al., em 1953, que não resistia a seis horas de fervura, mas resistia a cinco; e outra estirpe que resistiu à ação do vapor durante uma hora, mas não à autoclavagem a 117°C por 10 minutos (81).

Esta resistência dos esporos varia até dentro da mesma estirpe. Verificou-se que, em certas estirpes, antes da ingestão experimental, só 0,1-0,2% podiam sobreviver à temperatura de 100°C durante 4 minutos, enquanto que, depois, tinham uma resistência maior (75). Também há os casos em que a resistência é devida à concentração microbiana, como num observado em que $1,4 \times 10^4$ de microrganismo resistiram 10 minutos a 100°C, na concentração de $1,3 \times 10^5$ quase atingiam 20 minutos; e suportavam 8 horas a 100°C, se a concentração era de $1,6 \times 10^6$ (26). Também varia a resistência, segun

do os meios usados, como no caso do fosfato tampão, que aumenta a resistência (57). Porém, sempre se deve considerar a interferência de outros fatores, como a presença de água, o pH, certos cátions, a idade do microrganismo e substâncias químicas (13). Experiências mostraram que esporos com resistência ao calor perdem-na, quando a carne que os contém é aquecida a 70°C por 30 minutos; mas não a perdem, sensivelmente, em caldo reforçado para Clostridia (10). Verificou-se em 1975, para seis estirpes, que a temperatura na qual os esporos se formam não tem influência na sua resistência térmica, embora as estirpes variem entre si na suscetibilidade do calor (130). Com temperaturas mais baixas, os esporos quase não são afetados, mas as células vegetativas, a 5°C, 10°C e 15°C, são reduzidas numericamente a 1/3, ao fim de 13 dias; e a 1°C são reduzidas a 1/5; a temperaturas abaixo de zero, na carne bovina a pH 5 a 8, são destruídas muitas células vegetativas a 5°C, mas são menos destruídas a 20°C; quanto aos esporos, sofrem pequeno decréscimo a 20°C, mas a 5°C sofrem um pouco mais (10). A - 17,7°C, a recuperação de células vegetativas contidas num molho de frango, farinha de trigo, leite em pó desengordurado e sal, era de 4,29%, no máximo, ao fim de 90 dias, e 3,69%, ao fim de 180 dias; mas, se os esporos eram tratados com solo e secos, a sobrevivência era de 37,9% e 10,9%, respectivamente (163). O choque frio sobre as células faz-se sentir mais na fase exponencial, enquanto que na fase estacionária as células são mais resistentes e mostram menor letalidade (175).

1.2.3. Reação de NAGLER

Quando um microrganismo produtor de lecitinase C, como, por exemplo, qualquer tipo de C. perfringens, cresce em meio contendo lecitina, a enzima solúvel difunde-se a partir das colônias, ataca aquela substância na ligação glicerol-fosforilcolina e cinde-a em fosforilcolina e em diglicerídeo.

MOLÉCULA DE LECITINA*

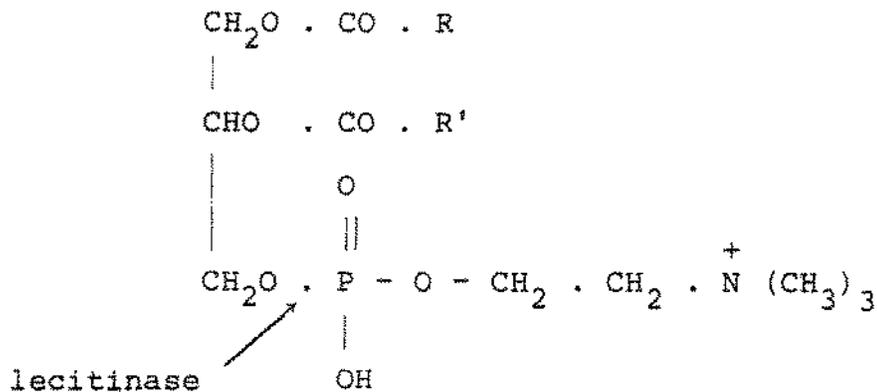


Fig. 1. Local onde é atacada a lecitina.

Forma-se, assim, um precipitado, composto principalmente de proteína tornada insolúvel, cujo resultado visível é o aparecimento de um halo opaco à volta das colônias (187). Originalmente, essa reação observada por Nagler, era feita em meio de cultura contendo soro humano, mas, mais tarde, verificou-se que um meio, contendo 5 - 10% de uma emulsão feita com uma gema de ovo e igual quantidade de solução salina (108, 185), produzia uma reação forte.

* Transcrito de 187

A lecitinase é excretada pelas células para o meio que contém o germe, porém as estirpes que produzem esta diástase em pequena quantidade retêm aproximadamente 50% dessa substância dentro das células (30). Sabe-se que as boas condições para multiplicação do microrganismo não são necessariamente as mesmas para a produção da lecitinase (119).

A extensão do halo de lecitinase varia de estirpe para estirpe, de harmonia com a produção de toxina α que lhe é própria (119, 188), tendo sido verificada uma relação inversa entre a resistência térmica do C. perfringens e a atividade da lecitinase. Assim foi verificado que é menor a atividade nas estirpes resistentes ao calor e maior a atividade de lecitinase nas menos resistentes (185). De tempos a tempos, ocorrem variações dentro da mesma estirpe (188), embora se tenha verificado que, em alguns casos, a produção de lecitinase não se alterava mesmo depois de doze transferências diárias da cultura (185). Vários autores acham que o cálcio é necessário para a atividade da lecitinase e a ótima atividade desta dependeria da natureza do tampão (88).

Há que considerar ainda a existência de estirpes não toxigênas de C. perfringens, que, portanto, provocam reações de Nagler negativas (190). Quando as placas que foram incubadas em anaerobiose são posteriormente mantidas no ambiente de aerobiose, aparecem zonas adicionais externas, à volta da opalescência primitiva, sem demarcações bem nítidas, mas apresentando o limite externo de tom mais intenso que o restante da área opalescente (108, 190).

Há Clostridia que necessitam várias passagens em caldo de carne moída e cozida, para produzirem a reação característica de lecitinase (182); da mesma forma podem produzir essa reação por transfe

rência, com intervalo de 6-8 horas, em caldo de soja-tripticase (B.B.L.) com 1% de proteose-peptona nº 2 (Difco), a pH 6,7 (102).

Além de espécies do gênero Clostridium (C. oedematiens, C. sporogenes, C. haemolitycum, C. botulinum, etc.), também outros microrganismos apresentam reação de lecitinase, como o Bacillus lacticola, B. tumefaciens, B. megatherium, B. cereus, B. mycoides e espécies aeróbias do gênero Actinomyces e Aspergillus (104).

1.2.4. Atividade da Lipase

As lipases dos Clostridia não cindem compostos gordurosos como a lecitina, mas conseguem esta ação sobre gorduras livres existentes na gema de ovo, produzindo glicerol e ácidos graxos, substâncias insolúveis no meio de cultura e algumas outras com pontos de fusão acima de 37°C. Assim, produzem opacidade no meio, usualmente só na parte inferior das colônias, pelo que este fenômeno se diferencia da reação difusa da lecitinase. Complementarmente, os Clostridia lipolíticos também produzem uma película com brilho de madrepérola, que cobre as colônias e às vezes se estende além delas, mas pouco além (187).

Além destas distinções em relação ao halo de lecitinase, acrescenta-se que este já se observa em 24 horas, ao passo que a atividade da lipase demora 48 horas para ter a máxima evidência e, ainda mais, a película de brilho aparentando madrepérola pode ser posta a flutuar sobre água que se deite na placa de meio com gema de ovo (187). Com tripsina, que dissolve a opacidade criada pela lecitinase, ou usando uma solução saturada de sulfato de cobre, que dá aos ácidos livres uma cor verde-azulada, pode-se também fazer a distinção entre as duas reações enzimáticas apontadas (83).

A opacidade restrita e a película com brilho de madrepérola, duplo aspecto resultante da atividade lipolítica, são produzidas pelo C. sporogenes e pelo C. oedematiens tipo A, mas este ainda produz lecitinase, sendo, sob este tríplice aspecto, o único entre os patogênicos (187).

1.2.5. Mecanismo da Ação do Germe

Desde os estudos de 1957 até ao fim da década de 60 não havia evidência da formação de enterotoxina pelo C. perfringens. Admitia-se que somente grandes quantidades de microrganismos deveriam ser ingeridos para produzirem a sintomatologia da doença (78, 81). Admitia-se ainda que a lecitina dos alimentos podia ser hidrolisada pela fosfolipase produzida pelo C. perfringens, com formação de fosforilcolina que produziria diarreia. Isso se provou em animais e não no homem (78), mas, posteriormente, também neste se conseguiu provocar a diarreia (40, 82). Também ninguém conseguia reproduzir, em animais e no homem, os sintomas de doença, administrando filtrados de culturas de C. perfringens contendo as toxinas então conhecidas (82). Admitia-se que havia uma relação entre a toxigenidade das células vegetativas e a resistência ao calor dos esporos; e que as estirpes com alta produção de lecitinase teriam grandes variações, de experiência para experiência (120) e que as que produziam pouca lecitinase eram freqüentemente produtoras de doença, pois, administrando-se 4×10^9 a 6×10^9 de células vegetativas com leite fervido, cinco pessoas apresentaram a sintomatologia e sete cordeiros também a apresentaram de forma suave, embora a estirpe empregada só tivesse traços de toxina α (66, 81). No decurso das experiências, quando se produzia a doença no homem ou no cor

deiro, a imunização com soro contra a toxina não impedia sua instalação (82).

Em 1969 admitiu-se que o fator tóxico estava localizado nas células e no meio de cultura (141). Nesse mesmo ano conseguiu-se provocar diarreia em coelhos, com injeção de C. perfringens no lúmen intestinal do íleo, mas não se a obtinha por via oral, o que se atribuía a fatores antimicrobianos do estômago; admitia-se que as possibilidades de se obter diarreia dependiam do número de células e da forma como se obtinham, sendo a melhor quando se inoculava um meio de esporulação (39, 52). Logo a seguir, em outro trabalho esclarecia-se mais o problema, pois obtinham-se diarreias e acúmulo de fluido no íleo, não só com extratos de células, mas também com filtrados concentrados de cultura (40). Provou-se que existia, nas duas formas de injeção, um fator tóxico sensível ao calor de 60°C durante 10 min., mas não de 55°C durante 5 min. Assinalou-se que extratos produzidos a partir de tioglicolato fluido inoculado com C. perfringens não provocavam aumento de líquido no íleo, mas este líquido se obtinha se se partisse de um meio de esporulação inoculado; observou-se também que o fator tóxico era ativo ao fim de 5 dias de armazenamento a 37°C, 4°C ou -21°C (40). O pH entre 6,0 e 11,0 não o afetava, mas havia completa perda a pH 1,0 e 12,0; entre 3,0 e 5,0 havia alguma atividade; a tripsina, lipase bacteriana, lipase pancreática e amilase não o inativavam (40), mas a pronase e protease de Bacillus subtilis inativavam-no (51). O fator pesquisado - a enterotoxina - é antigênico, presta-se ao preparo de soros antitóxicos em coelhos (51). Pode manter seu poder tóxico no estômago, se está presente em grandes quantidades de alimentos, pois estes funcionariam como elemento tampão (51). Sabe-se,

ultimamente, que a enterotoxina do tipo C de C. perfringens é idêntica a do tipo A (154).

As possíveis enterotoxinas (128) ou a enterotoxina são produzidas nos meios de esporulação e não aparecem nos meios asporogênicos (32, 38, 42) e voltam a ser produzidas quando os mutantes asporogênicos reverterem à forma esporogênica (51).

São de esperar-se grandes progressos no futuro, pois o estudo da enterotoxina pode ser feito no cachorro (11) e no macaco (38).

A esta altura das pesquisas, estava provada a existência da toxina, mas, não obstante estar evidente a etiologia da doença, ainda se classificava o C. perfringens como uma infecção, em 1971, admitindo-se, porém, que, provavelmente, seria uma intoxicação (8).

Concluía-se em 1971 que as discrepâncias havidas até então se deviam, em grande parte, ao fato dos investigadores não terem observado se as células se encontravam em fase de esporulação ou não e acrescentava-se que a enterotoxina que se forma nos micróbios, no intestino, se liberta após a lise dos germes, causando aumento de permeabilidade capilar, vasodilatação e movimento do fluido no intestino (69). Ela também provoca eritema na pele da cobaia e letalidade no ratinho; o soro obtido do coelho imune neutraliza essas ações, enquanto que as antitoxinas que costumavam existir nos soros para diagnóstico específico dos tipos A, B, C, D, E, de C. perfringens não as neutralizavam (161).

O antissoro produzido em coelho neutraliza a enterotoxina "in vitro", mas o anticorpo circulante "in vivo" tem pouco ou nenhum efeito sobre as enterotoxinas do lúmen intestinal (51, 69), embora exerça ação sobre as que entram na corrente sanguínea (69).

No meio de esporulação de DUNCAN & STRONG, a enterotoxina per

manece no interior das células nas primeiras 6 horas (178), aumenta até 10-11 horas, quando as primeiras toxinas extracelulares começam a aparecer (51), e podendo continuar dentro das células por 16 horas ou mais (178). A extração da enterotoxina por tratamento sônico realiza-se principalmente 6 horas após a semeadura (178). Um choque térmico de 75°C por 15 a 20 min. ou a exposição das células a tratamento sônico suave, antes de se introduzirem no meio de esporulação aumenta o teor de enterotoxina (51). Ocorrem variações do teor da enterotoxina com a esporulação, bem como com as diferentes estirpes e, como se conhece já que há formação de esporos em churrasco de frango e hamburgos fechados em vácuo, também pode ocorrer a formação de toxina em produtos alimentares já preparados (51, 52).

O grupo de investigadores de Davis, na Califórnia, estudando os anticorpos de estudantes brasileiros, verificou que estes tinham títulos mais elevados que os do local (51). Verificaram também que pessoas empregadas na sala de abate em Belo Horizonte tinham títulos maiores que os empregados em outros locais do matadouro, além de que o gado revelava altos títulos*. Ainda verificaram que 75% dos tipos A de C. perfringens isolados de fezes ou carcaças de bovinos, 60% das estirpes isoladas de fezes de aves e 90% das do homem produzem enterotoxina (51).

* Comunicação pessoal sobre manuscrito a publicar de BRANT, P. C.; FRANTI, C. E.; TORRES-ANJEL, M. J.; BEHYMER, D. & RIEMANN, H.

1.2.6. Reações Sacarolíticas e Proteolíticas

Usam-se açúcares (especialmente glucose, sacarose e lactose) a 1% em água peptonada, como mais uma forma para diferenciar espécies do gênero Clostridium.

O uso dos açúcares, por um lado, e de um meio para ver a atividade proteolítica, como o ágar-leite a 10%, por outro lado, permitem uma divisão em sacarolíticos, em proteolíticos e em uma coisa e outra conjuntamente, como mostra o quadro I.

QUADRO I*

DIVISÃO DE CLOSTRIDIA, SEGUNDO AS SUAS PROPRIEDADES PROTEOLÍTICAS E SACAROLÍTICAS

SACAROLÍTICOS E PROTEOLÍTICOS	PROTEOLÍTICOS	SACAROLÍTICOS	INATIVOS
<u>C. bifermentans</u>	<u>C. histolyticum</u>	<u>C. perfringens</u>	<u>C. tetani</u>
<u>C. sordelli</u>		<u>C. oedematiens</u> B	
<u>C. sporogenes</u>		<u>C. oedematiens</u> A	
		<u>C. septicum</u>	
		<u>C. tertium</u>	

* Transcrito de (187).

O C. perfringens e o C. tertium, classificados como altamente sacarolíticos, fermentam a glicose, sacarose, lactose e maltose (quadro II, p. 22) e pode-se ver que todos os Clostridia apresentados no quadro I como proteolíticos e sacarolíticos, fermentam

QUADRO II*

ALGUMAS REAÇÕES ENCONTRADAS EM CLOSTRIDIA

	Reações da Gema de Ovo				
	Glicose	Maltose	Lactose	Sacarose	Ágar-Leite
<u>C. perfringens</u>	+	+	+	+	-
<u>C. tertium</u>	+	+	+	+	-
<u>C. septicum</u>	+	+	+	-	-
<u>C. oedematiens A</u>	+	+	-	-	+
<u>C. oedematiens B</u>	+	+	-	-	+
<u>C. bifermentans</u>	+	+	-	-	+
<u>C. sordelli</u>	+	+	-	-	+
<u>C. sporogenes</u>	+	+	-	-	+
<u>C. histolyticum</u>	-	-	-	-	+
<u>C. tetani</u>	-	-	-	-	-

* Transcrito de 185.

são a glicose e maltose, pelo que se pode estabelecer que os Clostridia fermentadores da lactose raramente são fortes proteolíticos (187). A maltose é o açúcar que permite maior formação de gás pelo C. perfringens e, se atribuirmos à glicose o parâmetro 100%, a maltose será 101%, a frutose 55% e a sacarose 45% (139).

1.2.7. Sorologia

Desde a altura em que se estabeleceu que o C. perfringens era um dos agentes das toxi-infecções alimentares, tem-se tentado recorrer ao auxílio da sorologia para a diferenciação de estirpes que eram indistinguíveis pelas propriedades bioquímicas ou toxicológicas.

A forma comum de preparação de soros é aplicarem-se, endovenosamente, seis sucessivas e crescentes doses de suspensão bacteriana em coelho, com intervalos de 2 a 3 dias (74, 81). Os testes de aglutinação, já em 1953, HOBBS, B. et al. (81) os faziam em lâminas ou em tubos, com incubação de 4 horas em banho-maria a 43-45°C e, depois, deixados 18 horas numa sala fria e mais 2 h, em outra, à temperatura ambiente.

BETTY HOBBS tinha preparado, já em 1967, dezessete tipos sorológicos sã para estirpes de C. perfringens resistentes ao calor (168); em 1968, dezoito (e vinte não resistentes ao calor); e, em 1973, o número dos resistentes ao calor já tinha aumentado para mais de vinte*.

Nos Estados Unidos, em Atlanta, no "National Communicable Disease Center", já havia 78 antissoros, em 1969 (17).

* Comunicação pessoal de BETTY HOBBS.

Estes números continuaram aumentando, em virtude de novos so rotípos que apareceram dentro do mesmo país, bem como em outros. Em 1966, agrupando-se estirpes de diferentes partes do mundo, obtiveram-se 67 lotes de antissoros e verificou-se ainda que só um terço das 171 estirpes isoladas de fezes de trabalhadores de alimentos eram tipificáveis pelos antissoros (60).

1.2.8. Características do Crescimento

1.2.8.1. Temperatura

À mesma temperatura, o crescimento do C. perfringens depende da idade da cultura. Uma cultura de quatro horas, servindo de inóculo, depois de lavada em solução tamponada, apresentou o máximo crescimento ao fim de 6 horas; com a mesma cultura, mas de 15 horas de idade, o máximo crescimento já apareceu mais tarde, em 10-12 horas; com uma cultura de 20 horas, o máximo crescimento alcançou-se ao fim de 20 horas (48). Também podem existir condições adversas para o microrganismo na altura da repicagem e, conseqüentemente, a sua resposta, à mesma temperatura, será diferente de outra repicagem do mesmo microrganismo (157).

Fatos como estes, existentes para o mesmo germe, mais se notam quando se estudam dados não concordantes entre os vários autores, mas de estirpes diferentes de C. perfringens.

Em 1961, foi demonstrado que havia comportamento semelhante de quatro estirpes hemolíticas e não hemolíticas; a 37°C nenhuma apresentou fase "lag" e multiplicavam-se rapidamente dentro de 5 horas; a 43°C havia apenas um ligeiro crescimento; a 23°C ocorria uma diminuição do número de germes até cinco horas e depois um au

mento em 24 horas; a 53°C as contagens caíam logo de início (26).
Todavia a 47°C havia aumento imediato que se continuava por 5 ho-
ras, em três das estirpes, mas uma delas, hemolítica β , mostrava
queda inicial e, ao fim de seis horas, alcançava a contagem das
restantes, enquanto que a 50°C essa mesma estirpe declinava mais
que as outras (26).

Anteriormente, em 1957, para outras estirpes fora encontrado
ótimo crescimento entre 37 e 44°C e, já em 1928, usava-se a tempe-
ratura de 48°C para isolar o C. perfringens de fezes (26).

Em 1963, para cinco estirpes estudadas o maior crescimento si-
tuava-se entre 35-45°C, tendo acima de 45°C duas estirpes mantido
o tempo de geração e as restantes o aumentado muito, mas nenhuma
crescia a 15°C ou 55°C (155).

York, por sua vez, verificou que três estirpes de C. perfrin-
gens não cresciam a 10°C, mas a 20°C já duas apresentavam maior
crescimento que uma outra (193).

Em 1975, estudos conduzidos sobre cinco estirpes apontavam
que nenhuma crescia a 5°C, mas a 15°C cresciam duas, a 22°C cres-
ciam três, de maneiras diferentes. Este estudo demonstrou ainda
que a 30°C e 40°C cresciam todas as culturas, mantendo-se popula-
ções elevadas durante 6 dias; a 45°C também cresciam todas, mas
decreciam as contagens ainda no primeiro dia; a 50°C não cresciam
duas e as outras cresciam pouco; e todas tinham o menor tempo de
geração entre 30-40°C (130).

Do conjunto dos dados destes autores se conclui que a tempera-
tura de 44°C é a que se mostrou melhor para quase todas as cultu-
ras e, no caso em que não era ótima, tampouco era inibitória, e
que de 15°C a 50°C ainda há crescimento para algumas estirpes, em

meios artificiais de laboratório.

A temperatura tem importância ainda na ativação dos esporos. A ativação aumenta entre 60°C e 75°C, atingindo o ótimo em 75°C, se mantida para alguns minutos, mas decresce depois, até alcançar 80°C, havendo variações de estirpe para estirpe, quando o pH está situado entre 5,5 e 7,0 (2). A germinação dá-se entre 7°C e 46°C, mas a melhor temperatura parece ser a 30°C, principalmente se estão incluídas no meio cistina e cloreto de sódio e excluídos o extrato de levedura e ácidos provenientes da hidrólise da caseína, que são inibidores (2).

Para ANDO, a germinação é mais evidente em soluções de Ca Cl_2 , $\text{NH}_4 \text{ Cl}$ e Na Cl , sendo necessários os cloretos (5), choque térmico a 75°C por 10 min e incubação a 40°C (4).

Convém notar que uma boa temperatura de crescimento pode não ser necessariamente ótima para a produção de toxinas e pode acontecer que a 50°C a maioria das células pereçam, mas as sobreviventes poderão então começar a se multiplicar em grande número (fenômeno de fênix) (157).

A equipe do laboratório de anaeróbios da Universidade de Virgínia, nos Estados Unidos, menciona 45°C como a temperatura boa para o crescimento destes microrganismos em meios de cultura em incubação (181).

1.2.8.2. pH

Nas experiências de SMITH, a pH 5,0 e a pH 8,5, não havia crescimento de quatro estirpes de C. perfringens; e entre 6,0 e 7,5 ocorria um crescimento muito bom (155). Nas experiências de FUCHS & BONDE, o crescimento ótimo situou-se entre pH 6,75 e 7,5

(48). YORK estudou também a influência da variação da temperatura, verificando, entre três estirpes em estudo, que uma a pH 4, 4 e à temperatura de 30°C já denotava crescimento, contrariamente ao que sucedia a 20°C (193).

Os valores de pH têm sempre que ser considerados em relação à atividade de água, sendo que baixos pH tinham menos efeito sobre a inibição do crescimento a baixos A_w , do que a altos (165).

Efeito interessante é o da capacidade de o Streptococcus dia
cetilactis inibir o crescimento do C. perfringens na proporção de 90%, em leite, e 99,9%, em caldo láctico, o que pode ser devido a efeitos tóxicos dos ácidos produzidos, além do abaixamento do pH (32).

De importância epidemiológica, deve-se ressaltar, como se fez quando se analisou a temperatura, que o ótimo pH para multiplicação pode não o ser para produção de toxinas (157).

Com o pensamento voltado para o fato de o C. perfringens, quando penetra no homem, ter que passar pelo estômago, inocularam-se estirpes produtoras de intoxicação alimentar e não produtoras em meio de DUNCAN & STRONG e foram-se tirando amostras e sujeitando-as a pH 1,0 e 2,0. Tal exposição provocava a redução dos microrganismos provenientes da fase inicial do crescimento até à de esporulação, mas, logo que esta começava (por volta de 5 horas no meio de esporulação), a redução se tornava menor (46). A pH 4,5, a redução era ainda menor.

1.2.8.3. Ácidos Aminados e Vitaminas

As necessidades de ácidos aminados e de vitaminas variam um pouco com as estirpes. Serão necessários 13 a 14 como média (151,

156), ou mesmo 15 (157). Há também necessidade de 5 a 6 vitaminas (151, 156) ou de 7 (162). Variam as opiniões entre os autores sobre determinadas substâncias. Por exemplo, a riboflavina e adenina não têm qualquer ação sobre o crescimento (48, 157) para uns, mas há quem as considere essenciais (151, 156).

Entre as vitaminas têm sido consideradas essenciais a biotina, pantotenato de cálcio, piridoxal, riboflavina, adenina, nicotinamida, uracil. Na ausência da nicotinamida, os microrganismos perdem a capacidade redutora dos sulfitos; a biotina estimula grandemente o crescimento, mas este também ocorre na sua ausência; a nicotinamida e o ácido nicotínico não terão qualquer efeito estimulante sobre o crescimento, mas observou-se que depois de várias passagens em meio rico neste ácido, algumas estirpes crescem melhor quando em presença das duas substâncias (48). O ácido ascórbico pode funcionar como agente redutor, mas melhor ação obtém-se com o ácido mercaptoacético (48).

Quanto aos ácidos aminados, o melhor crescimento obtém-se balanceando-os no meio, bem como os íons de sódio e potássio (48). A lisina e a glicina têm efeitos sinérgicos, mas a adição de serina tem efeito antagônico, reduzindo a ação dos dois primeiros e, em meio contendo todos os aminoácidos da caseína, aumenta-se o crescimento de microrganismos, removendo a prolina (48).

Em 1975, pela omissão de nutrientes individuais, verificou-se que 11 aminoácidos e duas vitaminas eram essenciais para o crescimento: arginina, ácido glutâmico, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofânio, tirosina, valina, ácido pantotêmico e piridoxamina (147). A lisina, em meios laboratoriais, não é requerida nem estimula grandemente o crescimento

(147).

O fato é que o C. perfringens necessita de muitos aminoácidos e fatores de crescimento, que só alguns alimentos têm condições de oferecer: carne, peixe, ervilhas, feijão, leite (156).

1.2.8.4 Alimentos

Já em 1953 houve a preocupação de se verificar o crescimento de C. perfringens em alimentos, tendo-se estudado este parâmetro em meio de carne cozida. Partindo-se de 50 esporos, obtinham-se 45.000 formas microbianas por mililitro de meio, em 6 horas; e 48 milhões, em 24 horas a 37°C, enquanto se obtinham somente 25.000, a 22°C (81).

Em 1965, verificou-se que um inóculo de 40.000 a 80.000 células vegetativas de C. perfringens, feito num molho de carne bovina, demorava 4 a 5 dias para que o seu número fosse 100 vezes maior, quando a temperatura era de 18,3°C; e que para cada 2,8°C de aumento de temperatura, até 29,4°C, havia um dia de diminuição para a contagem ser a mesma; a 46°C eram precisas somente 4 horas ou menos; a 49°C havia rápida morte e entre 59 e 15°C estabilização ou morte lenta (58).

Depois de cozidos, conforme os alimentos e a temperatura, a multiplicação das células pode ser tão rápida que se forma uma nova geração a cada 12 horas (52).

O estudo do crescimento em carnes verdes foi feito quando empacotadas a vácuo. A 15°C não havia crescimento, mas existia a 20°C, 25°C, 30°C e 37°C; no entanto, em meios laboratoriais, já se obtinha crescimento a 15°C (138).

A influência das condições de venda de carne nos Estados Unidos também foi investigada. 3,178 kg de carne foram empacotados a vácuo, em "cry-o-vac" e em seguida sujeitos ao congelamento parcial por nitrogênio líquido (o que provocou a formação de uma crosta superficial de gelo de cerca de 0,5 centímetros); depois a carne foi acondicionada em caixas de "STYROFOAM", as quais foram armazenadas a 22°C por 72 horas ou 2°C por 21 dias. Em seguida a carne foi cortada em fatias, que foram acondicionadas em travessas de plástico, embrulhadas em celofane e armazenadas a 50°C, sob luz fluorescente. Ao fim desta experiência, concluiu-se que o processo de congelamento e transporte pode ser feito sem perigo, usando-se a temperatura de 2°C por 21 dias, contrariamente ao que sucede a 22°C por 3 dias, o que provoca aumento de C. perfringens (129).

A carne bovina vendida nos Estados Unidos da América, aquela que só necessita de um cozinhamento adicional, é moída em discos com furos de 2,4 mm, juntada a polifosfatos, sal e proteínas, empacotada num invólucro fibroso e submersa em água a 88°C por 15 minutos e depois resfriada e congelada a -23°C a -28°C. Ao exame apresentou 37 % das amostras com C. perfringens, usando-se a técnica de enriquecimento (33).

Também se procurou saber qual era o comportamento do C. perfringens em meios de cultura, quando se substituíam carne ou triptícase por produtos de soja. Em meio de tioglicolato sem dextrose, substituindo-se triptícase por proteína de soja (92% de proteína), proteína de cobertura (80% de proteína) ou glicina de soja (80% de proteína), ocorreram tempos de geração mais curtos (23, 24). Outras proteínas da soja deram tempos semelhantes aqueles que se obtinham com triptícase, a farinha de soja e caseinato de

sódio, sobretudo, apresentaram-se como mais inibitórios para o citado microrganismo (23,24).

Tudo parece indicar que os produtos de soja, menos concentrados em proteínas (aproximadamente 50% - 55%), agem de forma inibitória, talvez porque não lhes tenham sido removidos produtos inibidores ou se lhes tenham sido juntados alguns ou porque as proteínas não tenham sofrido modificações que as tornem mais assimiláveis ao microrganismo ou as tornem solúveis (23).

A tripticase em relação à proteína de soja também aumenta a germinação de esporos ativados pelo calor (24).

Em bolos de carne bovina, a adição de carne de soja (1:5) (23) ou proteína de soja nas proporções recomendadas no comércio (146) não modifica substancialmente o tempo de geração do C. perfringens. O mesmo produto preparado com carne de peru permite crescimento lento dos microrganismos, mas a adição de glicinina da soja ou caseinato de sódio eleva o crescimento aos níveis dos da carne bovina. Em resumo, a adição de soja à carne de vaca não parece alterar o crescimento do C. perfringens, contrariamente ao que sucede com a carne de peru (23). Semelhantes experiências em bolos de carne de bovino de 7 x 7 x 4,5 cm, usando-se 125 a 150 g de carne e 6,25 g de vários tipos de soja, mostraram não haver diferenças significativas usando-se ou não a soja (142).

Se forem cultivados B. subtilis em 3% de caseinato de sódio, por 12 horas ou mais, reduz-se de 3 horas a fase "lag" de C. perfringens após posteriormente incubado. Se a inoculação do B. subtilis for em solução de proteína isolada da soja por 8 horas, ou mais, a fase "lag" do clostrídio reduz-se de 1,5 horas, dando impressão de que no meio aparecem proteínas por este mais facilmente assimiláveis

veis (143, 145).

1.2.8.5. Sais e Outras Substâncias

À temperatura de 30°C, obteve-se crescimento de C. perfringens em meio contendo 6% de cloreto de sódio e não se obteve com 6,5%; porém, trabalhando-se com outra estirpe, já não se obtinha crescimento mesmo a 4%; observou-se também que as concentrações que tinham efeito bacteriostático podem não ser bactericidas e que os microrganismos podiam recuperar-se, se colocados posteriormente em outros meios mais ricos (193).

O efeito inibitório dos sais anda de par com o efeito inibitório do pH, sendo as estirpes mais sensíveis a um também mais sensíveis ao outro (193); quanto às temperaturas, a inibição pelo sal é menor entre 25 e 37°C, mas maior fora destas faixas de temperaturas (156). Adicionalmente, se deve observar que os esporos mais resistentes ao calor também são mais resistentes ao sal (156).

O catião sódio é indispensável para o crescimento do C. perfringens, como o é o magnésio, bem como o íon amônio (48). O fosfato de sódio, o de potássio e o cloreto de amônio, de ferro e de magnésio, quando presentes em concentrações ótimas, dispensam o uso de outros nutrientes inorgânicos (48). Culturas em meio de tioglicolato fluido, a que se adicionou cloreto de potássio, têm maiores fases "lag" e menor crescimento (165).

Usando-se 5 estirpes de esporos de C. perfringens, inoculadas em soluções de 7,5% a 17% de cloreto de sódio, 3.700 p.p.m. a 23.000 p.p.m. de nitrato de sódio e 370 p.p.m. a 2.300 p.p.m. de nitrito, verificou-se que quatro sobreviveram pelo menos 48 horas. A 80°C, por

6 horas, em 10% de cloreto de sódio, 3.000 p.p.m. de nitrato e 1.000 p.p.m. de nitrito, houve sobrevivência de células vegetativas (55).

A carne moída de suíno, contendo 3% de cloreto de sódio, 500 p.p.m. de nitrato e 200 p.p.m. de nitrito de sódio, inoculada com esporos de C. perfringens e aquecida a 80°C durante 60 minutos, depois de permanecer 3 dias a 3°C, mostrou sobrevivência destes microrganismos, embora houvesse diminuição de seu número (55).

Presuntos pulverizados com 17,9% de cloreto de sódio, 1.500 p.p.m. de nitrato e 980 p.p.m. de nitrito de sódio, curados durante 7 dias, a 3°C, numa cuba com salmoura, contendo 15,8% de cloreto de sódio e 1.300 p.p.m. de nitrato e a mesma quantidade de nitrito de sódio, atingindo posteriormente, em defumação, 61°C durante uma hora e, na seqüência, injetados com salmoura contendo 20 esporos por mililitro, mostraram sobrevivência do microrganismo nos vários estágios da cura, (55).

Esterilizado por filtração, o meio de tioglicolato fluido, que continha 6% de cloreto de sódio, 10.000 p.p.m. de nitrato e 400 p.p.m. de nitrito de sódio, inibiu células vegetativas (55).

Em meios laboratoriais e não em carne, estirpe não resistente ao calor e sem ser sujeita a injúria térmica prévia tinha o crescimento inibido a pH 6,0 e 0,04% de nitrito de sódio, enquanto que a pH 7,0 precisava de 0,4% de nitrito para ser inibida. A mesma estirpe termossensível, sujeita a uma injúria de 90°C por 5 minutos, era mais sensível, precisando somente 0,02 e 0,1% aos pH citados (94). Para estirpes resistentes ao calor, verificou-se que também havia maior resistência ao nitrito de sódio.

Noutra experiência, em meio quimicamente definido, 80 a 400

p.p.m. de nitrito de sódio a pH 6,3 inibiram o crescimento de sete estirpes, enquanto que, a pH 7,2, a concentração necessária era de 800 a 1.500 p.p.m. (131).

Quanto à germinação, ela anda de par com o aumento da concentração do nitrito, o aumento da temperatura da incubação e o abaixamento do pH (36). Em laboratório, verificou-se que 0,01% a 0,2% de nitrito, à temperatura de 37°C, permite a germinação de uma estirpe de C. perfringens em 36 a 48 h; que, com 3,45% de nitrito, a 45°C e ao mesmo pH 6,0, a germinação demorou só 1 hora (37). Na mesma experiência, a pH 7,0, a germinação diminuiu muito; e a pH 8,0 foi nula. Mesmo 4% de nitrito a pH 7,0 ainda permitem a germinação (37).

Quanto ao cloreto de sódio, as concentrações acima de 6% preveniram a germinação de uma estirpe de C. perfringens em meio laboratorial; e entre 3 e 6% houve germinação (37).

Em 1975, num meio quimicamente definido, verificou-se que a inibição do C. perfringens era mais fácil se o meio fosse autoclavado, sendo necessária uma concentração de nitrito 20,3 vezes maior para inibir o C. perfringens em meio esterilizado por filtração (126, 134). Admitiu-se que haveria uma reação do nitrito com a célula microbiana, tornando-a incapaz de se multiplicar e verificou-se que as células recuperadas de um meio com nitrito mostravam-se incapazes de iniciarem a multiplicação num outro meio sem o mencionado sal (133).

Em meio quimicamente definido, a pH 6,3 ou 7,2, se se adicionava o nitrito, depois da esterilização por filtração, o conteúdo do sal mantinha-se mais ou menos o mesmo; na incubação de 18 - 24 horas, a 43°C, o nitrito reduzia-se em 50 - 65%; se autoclavado,

havia logo uma redução de 30 - 50%; e, se depois era conservado a 43°C, reduziam-se ainda 35-90% (135).

Por isso, não se crê que o nitrito reaja com o microrganismo, mas aceita-se que se forme um composto, com o aquecimento, e sabe-se que ele não é uma nitrosamina (135, 184).

Ultimamente, verificou-se que, num meio com nitrato, nitrito, cloreto de sódio e glicose, o Streptococcus faecalis reduzia muito o crescimento de duas estirpes de C. perfringens, mas não havia redução quando o meio não tinha os dois sais e glicose, a qual o S. faecalis, em anaerobiose, converte em grandes quantidades de ácido lático, que talvez seja o inibidor (171).

O tamanho do inóculo tem importância, sendo os inóculos maiores mais dificilmente inibidos pelos nitritos (131, 133). Também é importante o tempo de aquecimento do meio com nitritos, parecendo que surge um inibidor tanto mais efetivo quanto maior o tempo de autoclavagem (131, 133). Com o aumento da concentração da glicose nos meios com caseinato de sódio ou de proteína isolada de soja, aumenta também a fase "lag" do C. perfringens; por outro lado, a adição de tripticase, Fe^{++} Ca^{++} e Mg^{++} , tem ação oposta à da glicose (144).

Também se verificou que a adição de sorbato de potássio (0,1%) à massa de salsicha não provoca qualquer modificação em relação ao comportamento do C. perfringens (174).

1.2.9. Habitat

1.2.9.1. Fezes

Em 1953, quando ainda se supunha que sã as estirpes resisten

tes ao calor eram as causadoras de toxi-infecção alimentar, só se encontraram 2,2% de fezes positivas em pessoas normais, 15,1% em pessoas idosas em hospitais, 53,3% em pessoas que ingeriram alimentos contaminados por C. perfringens, mas que não ficaram doentes, e 89,9% em pessoas envolvidas em surtos (81).

Verificou-se que, com o passar do tempo, decrescia o número de pessoas com fezes positivas. Assim, de 19 pessoas com a intoxicação e com os germes nas fezes, após 13 dias, só 6 eram positivas entre 10 examinadas; após 26 dias, só 1 em 4 examinadas; e, após 38 dias, só 1 entre 6 examinadas, registrando-se o caso de um cozinheiro que eliminou o germe durante vários meses (81).

Na Austrália foi verificado que crianças de 4 a 11 anos, pouco associadas com alimentos preparados na escola, e pessoas com permanência não superior a 6 horas em hospital apresentaram 1,5 a 6% de amostras de fezes positivas para C. perfringens resistentes ao calor, enquanto que pessoas de 10-18 anos, que comiam alimentos preparados na escola ou que estavam há mais de 18 dias no hospital, assim como as aborígenes mostraram 15,1 a 25% de fezes positivas para o mesmo germe (166). Não se encontravam diferenças com relação ao sexo nem com a estação do ano. Na mesma família, o mesmo sorotipo podia ser portado por duas ou mais pessoas e 5 a 10 semanas mais tarde podia existir uma estirpe diferente da que houvera. Famílias com pouca higiene revelaram 92% de casos, havendo nelas uma pessoa ou mais com o microrganismo, enquanto que as famílias com boa higiene só denotaram 20% de casos positivos (166).

Em surtos estudados na Inglaterra, entre 1949 a 1952, em 129 exames de fezes de doentes com toxi-infecção, 116 foram positivas, enquanto que de 385 pessoas não em risco só 20 tinham C. perfrin

gens resistentes ao calor (81). Os dejetos eram muito contaminados, sendo 40 a 100% das amostras portadoras daquelas estirpes (81).

Na Itália, foram examinadas fezes de 302 trabalhadores de uma indústria de supergelados e verificou-se, por técnica de enriquecimento, que 19,8% eram portadores de estirpes de C. perfringens resistentes a 100°C durante 60 minutos (104).

Com as técnicas atuais e mais acuradas de isolamento, o número de amostras positivas é muito maior, pois elas incluem os termossensíveis. Em Louisiana, encontraram-se 171 casos humanos positivos (78,1%), quase tantos como para Escherichia coli (79,9%) (60). Neste caso, 62,6% das amostras acusavam apenas uma estirpe, 37,4% tinham duas ou mais e só 9 amostras das 171 revelavam C. perfringens resistente ao calor por 1 hora a 100°C.

Para outros autores, as estirpes sensíveis são encontradas em quase 100% das amostras de pessoas sãs (26, 77, 167).

Na Inglaterra, em cinco toxi-infecções devidas a germes sensíveis ao calor, verificou-se numa das toxi-infecções que, em 17 amostras de fezes analisadas, 15 apresentavam contagens que iam de 7×10^5 a $2,5 \times 10^7$ /g; numa 2ª toxi-infecção, as fezes coletadas 7 a 9 dias mais tarde mostraram que, em 11 amostras das 21 examinadas, havia a média de $2,5 \times 10^2$; num terceiro surto, todas as amostras eram positivas, denotando contagens de $1,7 \times 10^7$ a 5×10^7 /g; num quarto surto, em 6 amostras, havia de 6×10^6 a 1×10^8 /g; num quinto, havia de 2×10^5 a 3×10^7 /g, em 11 amostras (168). Em outros dois surtos de estirpes resistentes e não resistentes ao calor, houve contagens médias de 10^7 /g em um e 10^6 /g em outro (168).

As maiores populações do microrganismo em fezes de pessoas acometidas de toxi-infecção por C. perfringens foram comparadas,

mais tarde, com as populações constatadas em pessoas não doentes ou pessoas com diarréias simples (167):

QUADRO III

DISTRIBUIÇÃO DAS CONTAGENS DE C. PERFRINGENS POR GRAMA DE FEZES DE PESSOAS SÃS, COM DIARRÉIA E INTOXICAÇÃO

<u>C. perfringens/g</u>	Pessoas sãs	Pessoas com diarréia	Pessoas com intoxicação
5×10^3	20	35	25
5×10^3 a 5×10^5	25	31	38
5×10^5	<u>4</u>	<u>15</u>	<u>189</u>
Contagem média	$7,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	$8,5 \times 10^6$

A freqüência de amostras de fezes positivas para C. perfringens em trabalhadores de restaurantes em Belo Horizonte* foi de 44 em 50 e em matadouros de 43 em 50, não parecendo haver diferença entre sexos e idades (o que concorda com o que se passa na Califórnia); nessas amostras, 94% das estirpes são tipo A. Para 200 pessoas, também de Belo Horizonte, a distribuição das contagens

* Comunicação pessoal de P.C. BRANT & H. RIEMANN, em 1975, sobre manuscrito de BRANT, P.C.; FRANTI, C.F.; TORRES-ANJEL, M.J. & RIEMANN, H., a publicar.

era de 30 amostras com menos de $10^3/g$, 28 amostras entre 10^3 e $10^4/g$, 50 amostras entre $10^4 - 10^5/g$, 62 amostras entre $10^5 - 10^6/g$, 30 amostras com mais ou menos a $10^6/g$.

Na Escôcia, o tipo A de C. perfringens predomina sobre os outros tipos nas fezes: entre 1.147 culturas de fezes de oito espécies animais e do homem, 1.134 eram do tipo A, 3 do tipo B e 10 do tipo D (173). Por outro lado, 18,4% das amostras de fezes dos suínos são contaminadas por estirpes resistentes ao calor, bem como 14,6% das de ratos e camundongos e 1,7 das de bovinos (81). SALANI et al., em 1974, verificaram que na microflora cecal dos frangos há 15,7% de Clostridia (140).

Cães, gatos e outros animais domésticos abrigam C. perfringens no trato digestivo (77).

1.2.9.2. Solos, Poeiras e Moscas

Segundo SMITH & GARDNER (apud 151), o número de C. perfringens no solo é relativamente grande, podendo variar de 110 a 56.700 por grama, consoante os tipos de solos examinados. Também nos solos, o tipo que predomina é o A. Assim é que, de 196 culturas de 43 amostras de solos examinadas, 189 eram do tipo A e 7 eram do tipo D (173).

De poeiras de cozinhas foram isolados C. perfringens em quase 90% das amostras (109). Mesmo em hospital, na sala de operações, com ventilação-exaustão de ar, foi encontrado C. perfringens, sendo mais alta a proporção de amostras positivas no tempo seco. Mas a contaminação se excluía, se a ventilação era feita através de filtros (100).

Fato a apontar é a inibição de toxina ou mesmo do crescimento do Clostridium botulinum na presença de C. perfringens, em solos (158).

Moscas colhidas com isca num hospital, açougue, loja de peixe frito, matadouro, depósito de lixo, e examinadas em lotes, sempre se revelaram portadoras do germe, o que sugere, pois, que estas desempenham um papel importante na disseminação do microrganismo (81).

1.2.9.3. Alimentos

Os alimentos que deram causa aos primeiros surtos de toxinfecção alimentar que foram bem descritos, entre 1949 e 1952, eram todos de carne bovina cozinhada de véspera. Num caso em que se conseguiram restos do alimento, havia $4,5 \times 10^7$ microrganismos/g; e, em outros quatro surtos, o diagnóstico só foi feito pelos sintomas e contagem nas fezes (81). Os seis surtos, apresentados em 1959 por McKILLOP (109), todos foram veiculados por frangos, mas só em dois casos houve possibilidade de se obter o alimento incriminado e só em alguns houve possibilidade de se obterem as fezes.

Num caso descrito na Itália, em 1966, a carne de porco continha apenas 10^6 microrganismos/g (180).

Até 1967, vários alimentos tinham sido incriminados em surtos: empadas de carne de vaca, carne de vaca enlatada, de carneiro, pasta de peixe frito ("Agekamaboko"), frango com aspargos, caldo de carne, molho de carneiro, presunto moído e fatiado, ensopado de cordeiro, carne de vaca assada, peru assado, galantina, carne de porco, frango, peixe cozido (77), fígado de vaca, língua de vaca e carne de vaca moída (168).

Porém, sendo o C. perfringens um germe ubíquo, tem sido encontrado em muitos alimentos, mesmo sem terem sido causa de surtos de toxi-infecção.

HOBBS, B.C. et al. (81), com técnica de enriquecimento das amostras, constataram que 20% de carne suína e 24% da bovina eram contaminadas com estirpes de C. perfringens resistentes ao calor. Em 1959, ainda HOBBS, B.C. & WILSON, I.G. encontraram as mesmas estirpes em 4,3% de amostras de carne de vaca resfriada e 10,3% em carne congelada e desossada, importada pela Grã-Bretanha (apud 77).

NARAYAN (123), na Hungria, estudou dois grupos de bovinos, um com 103 animais, em descanso de 4 a 6 horas, e sem ingerir alimento havia 8 horas; e outro, de 26 animais, em descanso de 24 a 48 horas, aos quais não fora dada alimentação 12 horas antes do abate e água 6 horas antes. Depois do abate, quando se quebram as barreiras naturais à infecção (183), foram tiradas amostras profundas de carne, depois de se esterilizar a superfície, e verificou-se que havia 85,63% de carcaças contaminadas com Clostridia no 1º grupo, enquanto no 2º grupo havia somente 7,69% (123).

A invasão dava-se nos músculos (61,36%), nos gânglios linfáticos mesentéricos (57,95%), nos rins (37,5%), no fígado (31,80%), no baço (23,86%) e nos gânglios linfáticos musculares (21,59%), sendo que, na maioria dos casos, a contaminação por Clostridia era abaixo de 10 por grama.

ZAGAEWSKII (194) demonstrou que a incidência do C. perfringens depende também do estado sanitário dos animais:

QUADRO IV

INCIDÊNCIA DE C. PERFRINGENS EM CARNE DE BOVINOS APRESENTANDO
ALGUNS ESTADOS PATOLÓGICOS

Estado de Saúde	nº Animais	Frequência de <u>C. Perfringens</u>				População
		Fígado	Rim	Gânglios Linfáticos	Músculos	
Pericardite traumá tica	12	12	3	8	3	$10^3 - 10^8$
Contusão muscular	26	20	4	7	11	$10 - 10^3$
Fratura de coluna e membro post.	5	4	2	2	1	$10 - 10^3$
Broncopneumonia	8	6	1	5	2	$10^3 - 10^4$
Sadios	20	3	1	2	1	1

Em 1963, STRONG et al., examinando amostras de carne moída de bovino, encontraram 16% positivas; em amostras de bovinos em cortes, 8% positivas; e, em amostras de carne de porco, 4% positivas (164). MILAV et al., em 1970, em amostras de carne de vaca e de porco, moídas comercialmente, também encontraram 33% positivas (111). Em 1974, sem enriquecimento das amostras, em carne de vaca moída comercialmente, LADIGES et al. (95), em 95 amostras, encontraram 45 amostras (47,4%) com C. perfringens, assim distribuídas: 33

amostras continham população microbiana de 5 a 100; 6, de 101 a 200; 4, de 201 a 300; 1, de 401 a 500; e uma, 601 a 700/g. A viabilidade do germe decrescia para 3% ao fim de 4 meses de armazenamento, a -20°C.

HALL et al. (58), em 1964, incubando 262 amostras de carne em meio fluido de tioglicolato e, separando cada amostra em dois tubos, sendo um aquecido a 100°C por uma hora e outro usado sem aquecimento, encontraram 70% de amostras positivas de carne bovina, 58% de frango, 37% de porco, 47,6% em embutidos (lingüiça, "mettwurst") e 4,7% em carnes preparadas para comer, sem necessidade de aquecimento (carne em fatias, sanduíches). Das 180 estirpes isoladas, só uma tinha resistência ao calor de 100°C por 1 h.

IENISTEA et al., em 1974, em 20 amostras de carne de porco, 20 de salsicha e 5 de frango, encontraram respectivamente 2, 5 e 3 amostras em Clostridia redutores do sulfito, com contagens inferiores ou iguais a 10 germes/g (84).

SIDORENKO et al., em 1969, em 1000 amostras de carne de vaca, encontraram que aproximadamente 30 - 50% continham C. perfringens; e, de 275 amostras de massa de embutir, 48 a 100%, conforme a espécie, também alojavam o microrganismo (152). Também NICHIPERUK, V. (124), em salsichas pasteurizadas, defumadas ou semi-defumadas, encontrou diminuição dos germes depois do tratamento térmico, mas registrou crescimento, quando postas à temperatura de 18-22°C.

A penetração de C. perfringens através dos invólucros naturais ou artificiais usados nos embutidos também se estudou: colocando-se salsichas numa suspensão líquida, notou-se a penetração através de 1% dos invólucros (152).

SELIGMANN, entre 1360 amostras de carne e produtos de carne

examinadas, encontrou 92 com C. perfringens, tendo 21 mais de 100 microrganismos/g (149).

Carnes enlatadas que mostraram estofamento, só 0,14% tinham C. perfringens, segundo KAFEL (89). Salsichas de uma produção normal, que tinham sido injetadas no centro com 50.000 a 500.000 células, depois de pasteurizadas a 70°C, por 20 minutos, e armazenadas durante 8 horas a 12°C, não mais apresentaram microrganismos em 1 g (89).

Na Itália (180), conservou-se, em temperatura de + 4°C, uma carne ensopada, que tinha 10^6 /g de C. perfringens e dera origem a um surto de toxi-infecção, verificando-se que, ao fim de 12 meses, a contagem era 10^3 a 2×10^3 ; e, ao fim de 4 anos, ainda era 0,01 - 0,15/g.

STRONG et al., em 1963, analisando produtos alimentícios sem enriquecimento, encontraram 2,7% das amostras positivas entre as congeladas (empadas de peru, de carne, etc.); 1,8% entre as preparadas em casa (carne de vaca com milho; feijão com hamburgo, etc.); e 16,4% entre carne de vaca, de frango e peixe, em conjunto (164).

MCKILLOP, em 1959, em cultura direta, examinando 6 amostras de peixe cozido, observou que só uma continha C. perfringens (109).

O C. perfringens não é um habitante normal da flora do peixe, contudo, se estes vivem em águas poluídas, podem-se contaminar. Neste caso, na primeira hora o número de microrganismos aumenta em um ciclo logarítmico; depois, o número declina durante 120 horas, para se manter constante até 288 horas, pelo menos (106).

Em 1974, em West Point, no Estado de Washington, verificou-se que 38,3% de amostras de sedimentos marinhos, junto a locais onde

se lançam dejetos, eram positivas para o microrganismo; em local mais afastado, já ocorriam somente 26,2%; e, ao largo da costa, a 850 m de profundidade, eram negativas. Idêntica situação se constatou com o conteúdo do estômago e intestinos de peixes capturados nesses mesmos locais (99, 106). Em outras oportunidades e no mesmo estado, coletaram-se amostras de sedimentos durante 3 anos sucessivos, verificando-se não haver variações com as estações do ano e admitiu-se que todos os microrganismos fossem de proveniência terrestre (através dos rios, dejetos, descargas de fábricas), pois as águas marinhas têm temperaturas no limite das possibilidades de multiplicação dos microrganismos; no verão, há poucas possibilidades de multiplicação junto da costa e isso é impossível nos sedimentos fora da costa, onde as temperaturas raramente excedem 10°C (105).

Ocorre, porém, contaminação posterior à captura do pescado e INAL et al., em 1974, encontraram 4 peixes do mar, em 60, com contagens menores ou iguais a 10^3 de C. perfringens (85). SOHN et al. (159), em 653 amostras de peixes e mariscos examinadas, encontraram 242 positivas para C. perfringens.

Porém, STRONG et al., examinando 11 peixes crus, não encontraram nenhum contaminado, mesmo usando técnica sem enriquecimento (164), mas MCKILLOP, em 6 amostras de peixe preparado, encontrou uma contaminada (109). BUROW (21, 22), em 1974, em 24 peixes apanhados frescos e vendidos alguns vivos em Istambul, encontrou 29% contaminados. Outros 70 peixes trazidos resfriados sob gelo de Ancara, descongelados posteriormente e lavados vez por outra durante a venda, apresentaram 20% positivos. No 1º caso, havia 9 a 500 microrganismos/g; e no segundo, 10 a 15/g.

Em frangos, McKILLOP (107), em cultura direta, encontrou sô uma amostra positiva em sete examinadas. LILLARD, em 1971 (98), verificou que o número de C. perfringens era menor que $10/\text{cm}^2$, na superfície do peito de frango, depois de sair do tanque de resfriamento. Antes do frango entrar no tanque de resfriamento, logo depois da lavagem, não se encontrou o germe, mas logo à saída do tanque de resfriamento, usando técnicas de enriquecimento, encontraram-se 10% das amostras com o microrganismo alojado na superfície do peito. Porém, no pescoço, a contaminação encontrada foi em 38,5% das amostras (98) ou em 40% - 50% (53); a contagem de Clostridia, no pescoço, chega a ser até 1000 vezes maior que no peito (110). As maiores contagens em frangos encontram-se nas penas e, por isso, no tanque de escaldamento há mais C. perfringens que no de resfriamento por agitação mecânica; e neste, mais do que no que não tem agitação (110). LILLARD, em 1973 (97), encontrou variáveis percentagens de C. perfringens, consoante a fase do abate. No coração, fígado e papo, achou, logo após o abate, 0%, 0% e 36,4%, respectivamente; depois do escaldamento, 18,2%, 50% e 50%; antes da inspeção, 0%, 14,3% e 14,3%; depois da inspeção 4,5%, 18,2% e 22,7%, respectivamente.

ROBERTS, em 1972, aplicando o método de enriquecimento em amostras de frangos congelados, encontrou 63% positivas (137). GIBBS, em 1971 (54), verificou que 19 a 35% das carcaças de frangos estavam contaminadas com Clostridia.

Em frangos cozidos, McKILLOP (109) encontrou, num total de 46 amostras enriquecidas, 24 positivas. Continuando a investigação para saber a causa de tão elevado número, verificou que os 3 frangos eram resfriados à temperatura ambiente, de um dia para o outro,

dentro do molho. LILLARD; em 1971 (98), com técnica de enriquecimento de amostras, encontrou só 2,6% positivas em frangos cozidos; e, nas mesmas circunstâncias, SELIGMANN (150), em 121 amostras, encontrou 2,5% positivas.

Nas experiências realizadas por ROBERTS, 38 frangos assados tinham 3 amostras com menos de $5 \times 10^2/g$; 6, entre $10^3 - 10^4/g$; e 1 tinha mais de $10^4/g$. Ainda em frangos, conservados em estufa quente e examinados 8 horas depois da saída desta, foram encontrados 4% com C. perfringens (127).

Os condimentos, de tão largo uso no processamento da carne e peixe, também mostraram contaminação pelo C. perfringens: 4 microrganismos por grama em pãprica, 4 em pimenta branca, 4 em pimenta preta pulverizada, 12 em pimenta-cumarim e 0 em pimenta integral moída (87, 155). Os invólucros naturais, usados em embutidos, são contaminados em 86% dos casos; e os artificiais, somente em 2% (152).

Em 1974, sem técnica de enriquecimento, encontraram-se 33,3% de amostras positivas em pimenta desidratada e 52,3% em canela (96).

Em sopas desidratadas provenientes de diversos países, usando-se enriquecimento das amostras, encontraram-se 18,2% positivas, embora tivessem como preservativos sulfito de sódio ou fosfato cálcio; molhos misturados com espaguete (constituídos de sal, açúcar, amido, alho, cebola, vegetais desidratados, queijo, leveduras e, às vezes, carne bovina desidratada) eram muito contaminados; sopas à base de carne de bovino, frango, peru, "bacon" eram pouco contaminadas (1 em 28) (121).

1.2.10. Isolamento

Embora haja, ultimamente, um interesse sempre crescente pelo estudo do C. perfringens, sobretudo em produtos comestíveis, o seu isolamento e contagem ainda não constituem um processo de rotina em controle de qualidade, em muitos países do mundo. Isso, por certo, será devido à natural dificuldade técnica, à falta de instrumental e à carência de familiarização dos microbiologistas com estes germes, contrariamente ao que sucede com os aeróbios.

A falta de equipamento adequado para a produção da anaerobiose, as dificuldades de importação dos aparelhos já consagrados e o preço dos produtos importados (como geradores de hidrogênio), as dificuldades de isolamento a partir das colônias e a de manter a pureza das culturas (27), a conseqüente falha de resultados dos exames bioquímicos formam um quadro que tem desencorajado o estudo da microbiologia alimentar dos anaeróbios.

1.2.10.1. Tratamento das Amostras

O princípio geral do rápido manuseio das amostras de que se querem pesquisar anaeróbios e até mesmo a manutenção na ausência do ar é importante para Clostridia sensíveis ao calor, mas não o é tanto para espécies aerotolerantes, como o C. perfringens. Afirma-se até que é desvantajoso homogeneizar em ambiente sem oxigênio, porque se reduzem as contagens de C. perfringens (12).

O valor da solução tampão de fosfatos para homogeneizar as amostras foi contestado, preferindo-se-lhe 0,1% de peptona (72). Tem sido muito utilizada a solução de Ringer, concentrada a um quarto para homogeneizar fezes a 1/5 ou 1/10 e, posteriormente, fa

zerem-se diluições em potências de 10 (167). É comum, para exame de fezes, usarem-se três técnicas de preparação das amostras: 1) suspensão das amostras em 1/5 ou 1/10 em solução de Ringer, diluições subseqüentes e posterior contagem em placa; 2) aquecimento da suspensão a 80°C durante 10 minutos e diluições posteriores em potências de 10; 3) aquecimento (de um caldo de carne contendo 1 grama de fezes) a 100°C, por 60 minutos ou 30 minutos, seguido de imediato resfriamento, e posterior incubação durante a noite e finalmente inoculação em placa (167, 168). Usa-se este último processo com caldo de carne, porque as estirpes resistentes ao calor, por se encontrarem em pequeno número, podem não ser detectadas sem o enriquecimento prévio (167, 168).

O tratamento das amostras em banho-maria a 80°C durante 10 minutos não se pode usar para esporos termolábeis, como o tipo E do C. botulinum, mas constitui uma prática usual para destruição das formas vegetativas de C. perfringens (83). Isto quer dizer que o desenvolvimento do germe que ocorrer posteriormente ao tratamento térmico será devido aos esporos e que, se os não houver, não haverá desenvolvimento. Por vezes, semear o inóculo sem prévio tratamento térmico pode não ser útil, porque há um grande desenvolvimento de contaminantes como o de E. coli, que pode encobrir o C. perfringens.

O processo de diluições sucessivas também deve ser usado em alimentos implicados em toxi-infecções alimentares, porque nelas se admite que haja alto número de germes eventualmente implicados (167); mas, em alimentos não envolvidos em toxi-infecções, o número de microrganismos pode ser inferior a 10 por grama e então o enriquecimento, antes da inoculação em placa, assegura maiores pos

sibilidades de se encontrar o C. perfringens (81, 167). Tendo em vista a possibilidade de ocorrerem baixas contagens de germes no alimento, também se procurará fazer as amostras da forma mais concentrada possível. Porque os alimentos cozidos dificilmente têm esporos, em virtude de já terem germinado, não se lhes deve dar tratamento térmico (78, 81).

1.2.10.2. Meios de Isolamento e de Enriquecimento

O processo do leite-litmus é bastante usado na Inglaterra e é preconizado pelo Ministério da Saúde e Habitação daquele país, para exame de C. perfringens da água. O coágulo da fermentação turbulenta, formado no meio, também pode ser provocado por outros clostrídios e, ademais, nem todas as estirpes do C. perfringens produzem a reação; alguns deles podem ser destruídos pelo calor que se usa para a execução da prova, pelo que a reação não é muito aceita (101).

Na tentativa de se obterem meios de isolamento mais acurados, muitos outros foram propostos, mas nenhum fica completamente isento de críticas. Essencialmente, os meios de isolamento se baseiam no uso do ágar-sangue seletivo ou no uso do sulfito como substância inibitória.

Nos meios contendo sulfito, com poucas exceções, os Clostridia reduzem aquela substância a sulfeto, que é precipitado na forma de sal de ferro, tomando as colônias uma cor negra. Porém outros microrganismos também apresentam este comportamento, como Salmonella spp. (113), E. coli, Proteus vulgaris, P. mirabilis e alguns exemplares de Streptococcus (103). Outros microrganismos,

como Bacillus spp e Staphylococcus, crescem sem produzir colônias pretas, mas competindo com o C. perfringens e acidificando o meio (103). Por esta razão se têm acrescentado substâncias que tentam ser seletivas, quanto possível, para o C. perfringens.

O nitrato de sódio é uma das substâncias já usadas e abandonadas, pois verificou-se que também inibe clostrídios (113). Neomicina, polimixina, sulfadiazina, cicloserina D, canamicina são algumas das outras substâncias inibitórias, ainda em uso. HANDFORD, em 1974 (62), conclui que todos os antibióticos usados são inibitórios também para o C. perfringens, especialmente se são juntados aos meios depois da autoclavagem, sem terem sofrido aquecimento.

O meio de Mossel (v. quadro V, p.52) ainda é hoje usado. Ele permite o crescimento de outras bactérias e mesmo de algumas, como Proteus, Salmonella, etc., que dão colônias pretas. Mesmo a adição de sulfadiazina aos meios ainda permite que alguns outros clostrídios, que produzem colônias pretas, cresçam no meio (7).

O S.P.S. (sulfito-polimixina-sulfadiazina) (v. quadro V, p. 52), que ainda hoje é muito utilizado, sobretudo nos Estados Unidos da América do Norte, contém sulfito, polimixina e sulfadiazina. Chega a ser inibitório para algumas estirpes de C. perfringens (74, 151), e às vezes falha em conferir coloração preta às colônias, além de que se vale, para confirmação das colônias suspeitas, da redução dos nitratos, muitas vezes difícil de se conseguir (153), e da esporulação, também difícil e pouco prática (151). Para se evidenciar a cor preta das colônias, tentou-se sobrepor uma segunda camada de meio sobre a primeira, previamente solidificada e inoculada com material suspeito (61). Tendo em conta que outros microrganismos também podem produzir colônias pretas no meio de S.P.S., muitas colônias com essa cor deverão ser confirmadas, para

QUADRO V

SUBSTÂNCIAS MAIS USADAS EM MEIOS DE ISOLAMENTO, CONFIRMAÇÃO E ESPORULAÇÃO DO CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

COMPOENENTES SUBSTÂNCIAS	ISOLAMENTO									CONFIRMAÇÃO					ESPORULAÇÃO			
	Ágar-sangue + NEO (Citrato de LUFOR) Anexo I	Ágar-sangue (de HANFORD) 1972 (63)	WILSON & BLAIR, 1924 (191)	Líquido de KESSEL, 1956 (113)	SFS de ANGELOTTI et al., 1962. (7)	TSN de MARSHAL et al., 1965. (103)	SFP (SHAHIDI, FERGUSON, PERFIDENS, 1971). (151)	TSC (de HARVEY et al., 1971 (89)	ORSA (de HANFORD et al., 1973. (62, 63)	NOCLING & TYRRE, 1947 (108)	G.O.L. (de WILLIS & HUBBS, 1958). (188)	GAJA (de WILLIS & HUBBS, 1959). (190)	G.O.L. mod. HALL et al., 1969. (61)	CO (de HANFORD, 1972) (63)	ELLNER, 1957 (43)	SEC (de ANGELOTTI et al., 1962) (7)	KIM et al., 1967 (91)	DUNCAN & STODOL, 1958 (41)
Água	1,5	2,5		1,5	1,5	1,5	2,0	2,0	2,0	2,5	2,0	1,2	2,0	1,5				
Ágar-licorizete glicosado			3,0												0,3	0,4	0,4	
Amido																		
Ácido de cálcio																		
Estabilizante de cálcio																		
Bromocresol púrpura																		
Caldo de coração-cérebro													100,0					
Caldo digerido																		
Caldo nutriente	100,0	100,0								100,0								
Canamicina, sulfato						0,0012												
Carne, caldo de infusão												100,0						
Carne, extrato																		
Carvão ativo																		1,0
Casamina, livre de vitaminas, ácidos da																2,0		
Cicloserina D, sol. 1%							4,0											
Cisteína																		
Citrato férrico				0,05	0,05	0,05												
Citrato férrico amoniacal							0,1	0,1	0,1									
Cloreto de cálcio													0,01					
Cloreto de cálcio, 2H ₂ O																		
Cloreto férrico			0,08															
Cloreto de sódio	0,5									0,2			0,5					0,5
Fosfato dihidrogênio de potássio										0,1					0,15			
Fosfato dihidrogênio de potássio, 7H ₂ O																		
Fosfato dipotássico													0,25					
Fosfato dissódico											0,5							
Fosfato dissódico, 7H ₂ O															5,0			1,0
Gema de ovo, emulsão salina (50:50)							10,0	10,0		10,0	10,0	3,75	10,0	10,0				
Glucose										0,2								
Hidrocloreto de cisteína																0,001	0,0001	
Hidrocloreto de tiamina																		
Lactose												1,0	1,2	1,0				
Lecitina, emulsão												15,0						
Leite, sem gordura																		
Levedura, extrato				1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5						0,3			0,5
Metabissulfito de sódio							0,1	0,1	0,1									
Oleanionocina, fosfato																		0,5
Peptona	1,0																	
Polimixina B, sulfato, (solução 1%)					1,0	0,2	0,3		1,0									
Polipeptona																1,3		
Proteose-peptona										0,24								1,7
Sangue de cavalo	5,0	10%																
Soda cáustica				0,01														
Soja hidrolizada													0,5					
Sulfadiazina de sódio					1,0								0,1					
Sulfato ferroso																		
Sulfato de magnésio															0,01			0,02
Sulfato nemicina	0,006					0,005												
Sulfito de sódio			2,0	0,1	0,05	0,1												
Sulfito de sódio 7H ₂ O																		
Tioglicolato de sódio													0,1		0,1	0,1	0,1	
Tripticase				1,5									1,5		2,0	2,0		
Triptona					1,5	1,5												
Triptose							1,5	1,5	1,5									
Vermelho fencol													0,002					
Vermelho Neutro										0,003	0,003	0,008						

se inferir a percentagem das de C. perfringens em relação ao total das colônias pretas existentes na placa.

O T.S.N. (v. quadro V, p. 52) usa triptona, sulfito e neomicina e produz somente 73% de colônias pretas que podem ser confirmadas como de C. perfringens e algumas colônias difundem-se, aparecendo uma coloração preta generalizada (114).

O S.F.P. (Shahidi-Ferguson-Perfringens) (v. quadro V, p. 52) generalizou-se bastante. Contém gema de ovo, polimixina e canamicina. Afirma-se que, a partir de alimentos inoculados, houve neste meio uma recuperação de 90,5%, cifra expressiva, pois em S.P.S. (B.B.L.) houve apenas 69,8% e em S.P.S. (Difco) somente 60,2% (151); por outro lado, o mesmo autor (151) afirma que C. bifermentans, C. botulinum, C. parabotulinum, C. sporogenes, C. novyi e C. haemolyticum também produzem colônias pretas e reação de lecitinase no S.F.P., como o C. perfringens.

Porém este meio, talvez por conter pequenas quantidades de lizosima, mostrou-se o melhor, entre os que têm sulfito, para recuperação de esporos que tinham sido subletalmente injuriados por temperaturas altas, a 115° ou 120°C (9). Num estudo comparativo entre o S.P.S., T.S.N. e S.F.P., verificou-se que a recuperação de células vegetativas do C. perfringens era maior no S.F.P. e sobretudo o era com esporos, mas o T.S.N. era o mais seletivo dos três, embora nenhum permitisse a total supressão de contaminantes (67).

O meio de T.S.C. (triptona-sulfito-cicloserina) constitui uma tentativa de corrigir os anteriores e baseou-se no S.F.P., substituindo os antibióticos deste por cicloserina D (v. quadro V, p. 52). A recuperação é menor, cerca de 5%, mas apresenta a vantagem de inibir os enterococcus que não o são no S.F.P. (68). Consideran

do que a reação de lecitinase nem sempre é nítida (de 21 estirpes, 8 não davam halo de lecitinase), foi retirada a gema de ovo, noutra modificação (74).

A favor se diz que só o T.S.C. e o T.S.C. sem gema de ovo são suficientemente seletivos para assegurar subseqüentes testes, sem interferência de anaeróbios facultativos, segundo HAUSCHILD et al. (73). FUZI et al. usaram também cicloserina D (800 microgramas por mililitro) em ágar-sangue (50) e afirmam ser superior à neomicina, pois consegue inibir quase todos os contaminantes, mesmo o Proteus vulgaris. O S.F.P. e T.S.C. continuam mostrando que às vezes as colônias se apresentam bastante grandes, sendo impossível a contagem quando estas são em número superior a 50 por placa; e, se se dilui a amostra, não há possibilidade de contagens (74).

O meio de O.P.S.P.A. (oleandomicina-polimixina-sulfadiazina-perfringens-ágar), no dizer do autor, era o único que inibia o C. bifermentans e o C. butyricum, que dão colônias pretas e grandes nos meios anteriores (62). Contrapôs, porém, outro autor (74) que os anaeróbios facultativos são menos inibidos pelo O.P.S.P.A. do que pelo T.S.C. e que havia estirpes com contagens baixas e mesmo uma que se não desenvolvia, o que foi refutado pelo descobridor do meio (62).

Um processo preconizado por LOWIS (101) usa várias diluições da amostra em caldo de carne cozida, a que junta polimixina e depois a redução do sulfito. Posteriormente confirma-se a presença de C. perfringens pela reação de NAGLER, com inibição desta pelo antissoro, vindo os resultados expressos em presença em 1 g ou em 0,1 g ou outra quantidade.

Quanto ao ágar-sangue, já em 1928, CHAPMAN (25) afirmava que

dava melhores contagens que os meios que produziam sulfeto. Dois outros grupos de autores já haviam reconhecido vantagens do ágar-sangue: SHAHIDI et al. (151), autores do meio de sulfito S.F.P., ao compararem-no com o ágar-sangue, dizem que o seu meio consegue melhores recuperações em algumas estirpes, mas não em outras, o que dá uma média de recuperação de 98,5% para o S.F.P., em relação a 100% do ágar-sangue; MOSSEL (116), autor de meios de sulfito, diz, em 1968, que o ágar-sangue pode ser usado quando o C. perfringens é predominante, porque olhos bem treinados reconhecem suas colônias sem muita dificuldade.

As vantagens do ágar-sangue são as de facilidade de obtenção e preparo, semeadura em superfície, nitidez das colônias (sem deformação), distinção entre colônias de C. perfringens e outras e evidência da hemólise (77, 167). Se se faz necessário estudar a hemólise, é importante a escolha do sangue, porque as hemolisinas do C. perfringens têm atividade diferente sobre os eritrócitos das várias espécies animais. Só a hemolisina teta é ativa contra os glóbulos vermelhos do sangue de cavalo, enquanto que para os eritrócitos de carneiro, além dessa toxina, também é ativa a toxina α (70, 83). Como todas as estirpes do tipo A de C. perfringens produzem toxina α e nem todas produzem toxina teta, as que não possuem esta toxina não produzirão hemólise no sangue de cavalo, embora produzam no de ovinos. Porém a adição de 0,5% de cloreto de cálcio ao sangue de cavalo torna este susceptível à toxina α e assim as estirpes clássicas do C. perfringens produzirão, neste caso, uma hemólise anular: uma interna de hemólise β , devido à toxina teta, e uma hemólise parcial, externa, devida à toxina α (83).

Na pesquisa de C. perfringens, deve-se usar um agente seleti

vo. O mais usado, até hoje, é o sulfato de neomicina, que permite suprimir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e obter melhor formação de colônias reconhecíveis do germe em causa (81, 83, 190). Há, contudo, microrganismos indesejáveis que ainda per sistem, como alguns bastonetes negativos ao Gram e, mais frequen temente, Streptococcus, Staphylococcus e bastonetes anaeróbios não formadores de esporos positivos ao Gram (45). Mas, entre outros, é inibida a E. coli (168).

A neomicina é aplicada à placa de ágar-sangue previamente se ca, na quantidade de 3 - 5 gotas ou 0,06 a 0,1 ml de uma solução a 1% de sulfato de neomicina (Upjohn) (168), sendo espalhadas as go tas com uma espátula de Drigalski e depois secadas. SUTTON et al., em 1968, aconselharam aquele número de gotas, como outros autores, mas, em 1971, aconselhavam somente 3 gotas (0,06 ml). Tais gotas eram obtidas pelos autores*, cortando pipetas de Pasteur de forma a terem uma seção de calibre 0,95 mm de diâmetro e usando as pipe tas verticalmente, ao deixar cair as gotas (112).

O sulfato de neomicina também pode ser usado com meios, como o de caldo de carne cozida, na quantidade de 250 mg por mililitro e não em maiores quantidades (190). Mais tarde verificou-se que nem essa quantidade deveria ser usada, mas, sim, 50 mg por milili tro (103).

Em alimentos não implicados em surtos de toxi-infecção alimen tar, devido à contagem microbiana poder ser baixa, pode ser usada uma técnica de enriquecimento da amostra, como o meio de carne co

* Demonstração pessoal de A.T. Willis.
Public Health Laboratory, Luton, Inglaterra.

zida de Robertson, ou caldo de fígado, ou caldo de glicose tripti case (77) ou ainda o meio de RIHA & SOLBERG (R&S) (132). O meio de carne cozida, tendo um potencial redox baixo (+ 0,04) (113), é o mais usado, servindo tanto para clostrídios proteolíticos, como para sacarolíticos. Neste caso, convém adicionar 0,5 a 1% (p/v) de glicose (83).

Fazendo-se diluições decimais sucessivas dum alimento, pode-se estimar a população microbiana através da técnica do número mais provável. Os inconvenientes são que o processo é laborioso, desenvolvem-se também outros microrganismos que dão contagens positivas falsas e podem existir efeitos antagônicos da flora mista dos alimentos (71, 113, 116), razões por que este processo não é muito usado (116).

1.2.10.3. Meios de Confirmação

As colônias ou as suspensões já citadas precisam ser confirmadas para se assegurar tratar-se realmente de C. perfringens. Para o meio de S.F.P., a confirmação é feita no meio de L.M. — lactose-motilidade —, puncionando este (que contém pouco ágar — 3^o/100 — e vermelho de fenol) até um terço da parte mais funda do tubo e verificando-se se os germes não se disseminaram (sinal de motilidade) e se houve aparecimento de cor amarela após incubação (151). Critica-se a sua falta de exatidão, afirmando-se que a fermentação motiva o deslocamento de bactérias e dá a falsa idéia de mobilidade do C. perfringens.

Os meios de confirmação mais empregados, quando não se usam os de sulfito para isolamento, são os que aplicam a reação de

lecitinase e fermentação da lactose.

O C. perfringens, semeado em meio que contém gema de ovo, mostra a reação de lecitinase para além das colônias, com variações conforme a estirpe; as colônias são lisas e de limites irregulares (108). Dado que outros microrganismos também produzem reação de lecitinase, usa-se a anti-toxina do tipo A do C. perfringens, para inibir a reação de lecitinase. As lecitinases do C. perfringens, C. bifermentans e C. sordelli são antigenicamente relacionadas e por isso a citada anti-toxina inibe não só o primeiro dos microrganismos, mas também os dois restantes (106, 187, 188, 189). Esta é a razão porque é necessário verificar se há fermentação da lactose, dado que, dos três, só o C. perfringens a provoca. WILLIS & HOBBS usaram, numa mesma placa, a gema de ovo, a lactose (1%) e o vermelho neutro (0,03%), para evidenciarem concomitantemente as duas reações, o que se torna bastante prático (188, 189). Estes autores secavam as placas 20 min a 37°C, pingavam três gotas da anti-toxina, espalhavam-nas por metade da placa, com uma espátula de Drigalski, e deixavam secar. A seguir, o microrganismo era estriado em linha reta, partindo da metade da placa sem antitoxina, atravessando perpendicularmente (fig. 26 a 34, p. 133 a 135) o diâmetro que divide aquela metade da placa que levou a antitoxina e terminando sobre a metade que a contém*. Uma estria de C. perfringens, depois de incubação, mostrará reação de lecitinase só na metade sem anti-toxina, crescimento da estria nas duas metades e um halo róseo ou avermelhado por fora da estria de semeadura e do halo de lecitina

* Demonstração pessoal de A.T. Willis.

Public Health Laboratory, Luton, Inglaterra.

se, devido à viragem da cor do indicador pela fermentação da lactose.

A incubação deve ser de 12 a 18 h para uns (189), 18 a 24 h para outros (188, 190) ou ainda 24 a 48 h (188) ou 12 a 60 h (122). Se as placas, depois da incubação, forem deixadas em condições ambientais, o halo avermelhado empalidece e as colônias avermelham intensamente (188). Antes da proposta de adição da lactose por WILLIS & HOBBS, em 1958, os meios não a continham e havia resultados satisfatórios, tanto que, em 1953, em centenas de estirpes, todas, com exceção de duas, deram a reação positiva (81). HANDFORD, em 1973, assinala também que, em sua experiência, o teste da lactose deve ser feito separadamente (63).

Pequenas variações no meio de gema de ovo podem afetar as reações de lecitinase do C. perfringens, como sucede quando se incorpora um excesso de hidrato de carbono (mais de 1%), que, com certeza, baixa exageradamente o pH do meio (62). O C. botulinum tipo E, em meios com menos de 1% de sacarose, muitas vezes não produz a película de brilho semelhante a madrepérola, embora produza um precipitado, o que se confunde com a reação de lecitinase (62).

Entre outras técnicas de pesquisa do C. perfringens, tem-se tentado a dos anticorpos fluorescentes. Estes, porém, têm o inconveniente de necessitarem muitos antissoros, pois o germe possui muitos tipos antigênicos (92).

A técnica de imuno-difusão também vem sendo estudada na identificação do microrganismo em causa, e parece ser promissora, todavia necessita mais pesquisa (56).

O exame microscópico de esfregaços de culturas coradas pelo Gram oferece uma informação auxiliar de certa valia (167).

É importantíssimo na identificação de Clostridia estar-se se guro de que as culturas estão realmente puras no período de exame, sempre se fazendo subculturas em placas aeróbias e anaeróbias, pa ra fins comparativos (185).

A confirmação das colônias deve-se fazer sobre 10% do total delas ou sobre um número aproximado à raiz quadrada do seu total (mas nunca menos de três, se as houver) (106, 115). Diz-se que a contagem, depois de incubação em nitrogênio, é, em muitos casos, maior que em hidrogênio (49). Segundo alguns, o dióxido de carbono favorece o crescimento de Clostridia, podendo ser misturado com ou tro gás, quando se forma a atmosfera anaeróbia, ou obtido pela in clusão de 0,1% de bicarbonato de sódio ao meio (apud 83); mas, pa ra outros, porém, ocorreria o inverso, ou seja, uma redução nas contagens (49).

Quando se pretende evidenciar as diferenças entre colônias anaeróbias e aeróbias facultativas e assegurar melhor contagem, de ve-se prevenir que o eventual crescimento de anaeróbios facultati vos, nas placas, pode tornar difícil a identificação do C. per fringens; mas se forem deixados em aerobiose, porque crescem os ae róbios, a distinção se tornará mais fácil (81).

Os meios de isolamento são baseados no princípio de que as cé lulas da amostra ainda estão viáveis, o que nem sempre é certo, principalmente se o material foi congelado ou esfriado, por longo tempo, ou foi aquecido ou houve queda do pH. Nestes casos, há que pesquisar-se alguns produtos do metabolismo celular, como a fosfo lipase, e correlacioná-los com o número das células ou então reali zar contagens microscópicas (157). Em estudos realizados em quinze laboratórios sobre amostras de alimentos envolvidos em surtos, ve

rificou-se também que o título de toxina a encontrado indica a mãxima população microbiana (65). Deve-se lembrar, finalmente, que um produto não é um todo homogêneo e pode-se-lhe retirar, eventualmente, uma porção menos contaminada ou não contaminada, durante a amostragem (78).

1.2.10.4. Incubação

Um dos processos mais comuns e econômicos para a obtenção de anaerobiose é o de se fazer vácuo e inocular hidrogênio na jarra ou estufa, usando-se posteriormente o paládio, como catalisador, localizado também dentro do recipiente.

Contra o uso do hidrogênio, tem-se argumentado que a reação catalítica do oxigênio é lenta, às vezes 45 min, o que poderá criar um vácuo, se a fonte fornecedora de hidrogênio já estiver desligada, em virtude da diminuição do volume do gás no recipiente (49). Esta reação também pode ocorrer, se existir bastante meio de cultura na jarra, em virtude do oxigênio aí contido não ter sido completamente removido na exaustão. Este difundir-se-ia depois no espaço do recipiente e formar-se-ia vácuo, por diminuição do volume do gás, e, se a jarra não estivesse bem fechada, poderia entrar até ar (49). Por prevenção, convém que a jarra permaneça ligada ao gás durante uma hora, através duma bola de borracha, que indicará, pelo esvaziamento, o consumo de hidrogênio. Com este procedimento, será suficiente apenas uma exaustão a 250 mm de Hg (49).

Pelo que se expôs e ainda porque há o receio de explosão, muitos preferem a inoculação de nitrogênio livre de oxigênio, em cada uma das quatro exaustões dos recipientes, a 250 mm de Hg, o

que dá um nível aceitável de menos de 0,1% de oxigênio, se o gás inoculado for 99,995% puro (49). Na Inglaterra, o gás em mais altas percentagens de oxigênio que a indicada acima (49) e isso também se dá em vários outros países*. Se o produto for menos puro que o desejável, o nitrogênio deverá ser passado sobre cobre aquecido e depois sobre uma solução de sulfato cromoso acidificada, para livrá-lo de oxigênio; ou, pelos menos, deverá sempre passar-se o conteúdo do cilindro pela solução mencionada, não só para remover o oxigênio, mas também a amônia, que pode invalidar o trabalho em organismos fixadores de nitrogênio (153).

Há uma grande gama dos Clostridia de acordo com as exigências de anaerobiose. O C. tertium cresce até aerobicamente em ágar-sangue (181) e o mesmo se dá com C. histolyticum (83); o C. perfringens não tem contagens alteradas até 5% de oxigênio, enquanto que o C. tetani, o C. septicum e o C. oedematiens têm tensões limitantes situadas entre 0,2 a 0,3% (49, 183).

Pelo fato do C. perfringens ser parcialmente anaeróbio, permite-se uma seletividade dos estritamente anaeróbios, usando-se exaustão dos jarros a -60 cm de Hg e depois injetando-se hidrogênio sem usar o catalisador (83), ou então usando-se nitrogênio e anidrido carbônico, depois de uma única exaustão a 24 polegadas**.

Para alguns, o anidrido carbônico é essencial antes das bactérias começarem a multiplicar-se, mas para outros não é necessário (48). Afirma-se que, fazendo-se a incubação de amostras só com

* Comunicação pessoal do Instituto de Física da UNICAMP.

** Comunicação pessoal de A.T. Willis.

nitrogênio ou só com anidrido carbônico, não há diferença sensível na fase "lag", como não há na logarítmica, pois, se para umas es tirpes é melhor o nitrogênio, para outras é melhor o CO₂ (125).

As exigências do potencial de óxido-redução variam com a es tirpe: uma estirpe de C. perfringens pode crescer mais profusamente, a um Eh mais elevado e na presença de pequenas quantidades de oxigênio, que outras, num Eh mais baixo e sem oxigênio livre (172), sendo que um potencial maior de óxido-redução terá um efeito adver so sobre a fase "lag" (17).

Como se disse, o potencial de óxido-redução não constitui, em regra, problema, porque o C. perfringens está próximo do limite que separa os anaeróbios — os limites dos valores de Eh são de - 125 a + 287 mv (172) ou - 200 a + 160 (157). Contudo, num meio nutritivo pobre, só suficiente para prover as colônias com o mínimo neces sário ao seu limite de visibilidade, é necessário atentar para es se potencial. Assim, as placas com 1% de peptona, sem carboidratos fermentescíveis, se deixadas em contacto com o oxigênio do ar, no momento de espalhar o inóculo, no começo da fase logarítmica, qua se 99% dos germes podem ser inibidos, mas o efeito tóxico do oxigê nio é diminuído, se há um agente redutor no meio (157). Também, quanto maior é o inóculo e mais ativa a sua fase metabólica, mais se cria um local de baixo potencial óxido-redutor e baixo pH (157).

Os meios de ágar-sangue são considerados indicadores de anae róbiose, pois a hemoglobina, nesta atmosfera, reduz-se, e as pla cas apresentam uma cor vermelho-púrpura, em vez de brilhante, o que também pode ocorrer por ação de bactérias (25).

Outra forma de avaliar-se a anaerobiose é misturar 1 ml de solução de Na OH a 0,02%, 1 ml de dextrose a 6% e 1 ml de azul de me

tileno a 0,015%, fervendo-se e pondo-se num tubo pequeno, dentro do continente de anaerobiose. A solução ficará incolor, enquanto se mantiverem as condições anaeróbias, pela passagem do azul de metileno à sua leucoforma (25).

Mais prático e correto, para muitos, é fazer-se uma incubação de um micróbio de conhecidas exigências anaeróbias, a par com as amostras em pesquisa.

1.2.11. Os Surtos

1.2.11.1. Preparação dos Alimentos

Parece-nos de toda conveniência mencionar experiências conduzidas por uma autoridade científica em 1959 e que hoje, a uma dezena e meia de anos, se revelam até enganosas, se tomadas de per si.

Aves contaminadas por C. perfringens não resistente ao calor, depois de cozidas e em seguida manuseadas assepticamente, foram distribuídas em dois bēqueres cobertos, um conservado em geladeira e outro à temperatura ambiente. Ao fim de 6 dias, nem o primeiro nem o segundo continha o anaeróbio, embora neste último houvesse moderada contaminação com aeróbios esporulados. Noutra experiência, as aves foram inoculadas nos músculos com estirpe resistente ao calor de 100°C durante 1 hora; a seguir, foram cozidas durante 2 horas e 40 minutos e depois foram transferidas para bēqueres com molho cobrindo até 1/4 dos frangos. Como na experiência anterior, não se evidenciou o germe, nem no molho, nem na carne. Na última experiência desta série, os frangos foram cozidos e, em seguida, o molho foi inoculado com uma estirpe hemolítica β , tendo-se verificado aumento dos germes no molho e nos músculos, nos frangos mantidos fora da geladeira, enquanto que não houve tal aumento nos conservados em geladeira (109).

Porém, em 1961, nas experiências conduzidas pelo "Medical Office of Health for Reading", a fim de responder à indagação do Serviço de Refeições Escolares sobre o possível inconveniente de se assarem carnes de noite para o serviço do dia seguinte, a situação ficava colocada nas proporções devidas. Assou-se, pelo método lento, que se perguntava se era o conveniente, um bloco de 2,270 kg de carne bovina. Verificou-se que se passavam 9 horas para que o centro geométrico do alimento atingisse 65,5°C, temperatura que se mantinha durante aproximadamente 7 horas, sendo, em média, a temperatura externa da carne 5,5°C mais alta que a interna, com o forno a mais ou menos 99°C. Alguns microrganismos, experimentalmente inoculados antes (Staphylococcus pyogenes e Salmonella typhi-murium), não eram recuperados, mas o era a estirpe resistente ao calor de C. perfringens (170).

No processo tradicional, com forno a mais ou menos 232°C, a carne atingia 65,5°C no centro geométrico ao fim de 3 horas, mantinha esta temperatura durante meia hora e, neste caso, recuperava-se C. perfringens em menor número (170). Considerava o autor que, dadas as dificuldades de se obterem esporos de resistência bem conhecida, as respostas eram pouco consistentes e muitas experiências seriam necessárias para eliminar as diferentes variáveis destes ensaios.

Mas, em 1972, foram realizadas experiências melhor conduzidas, utilizando-se dois tipos de fornos: fornos de ar úmido a 82°C e de ar quente a 213°C (169). Em pedaços de carne bovina, uns grandes, pesando 4,5 a 5 kg, e outros delgados, de seção 5 a 6,5 cm por 9 cm, pesando cerca de 2,7 a 3,2 kg (estes últimos embrulhados em polietileno, se processados em forno úmido), foram inoculados es

tirpes resistentes e não resistentes ao calor, esporos e células vegetativas. O centro geométrico das porções maiores demorava cerca de 1 hora para começar a aquecer. Depois de assadas as carnes, os centros atingiam 55°C, 56°C e 64°C e continuavam ainda a subir até ao máximo de 65°C, 68°C e 70°C. A temperatura de 60°C era atingida mais ou menos ao fim de 3 horas e meia nos dois tipos de fornos. O resfriamento à temperatura ambiente (15°C) dava uma perda de calor muito pequena e, mesmo depois de 7 horas, as amostras pequenas ainda não atingiam 15°C; o resfriamento entre 4° a 5°C foi melhor, mas não muito; o resfriamento a -30°C baixava o centro da carne a menos de 15°C em 3 horas e 40 minutos.

As células vegetativas foram destruídas durante o processo da assadura, mas os esporos resistentes e não resistentes ao calor subsistiram e as células cresceram mais durante o esfriamento a 15°C do que entre 4 a 5°C. Todavia não chegaram a atingir 108 por grama, quando o inóculo era de 105.

Outra experiência do mesmo ano completa os conhecimentos sobre o que pode ocorrer em operações culinárias posteriores (16). A carne bovina, assada até uma temperatura interna de 60°C, foi cortada em pedaços e inoculada superficialmente com cultura. Se a carne era mantida a 48,8°C, o número de C. perfringens aumentava sempre nas primeiras 12 horas e declinava depois de 18 horas; a 50°C, em 6 horas, aumentava 90% e este aumento também se verificava em 12 horas a 51,1°C; porém, se a cultura continha também Staphylococcus aureus e Salmonella enteritidis, não se constatava qualquer sobrevivente a esta última temperatura e tempo.

BRYAN et al. (19) mostraram que perus, pesando 10 kg aproximadamente, descongelados à temperatura ambiente de 20 a 30°C, demora

vam mais de 17 horas para atingirem 10°C, temperaturas que permitiam o crescimento do C. perfringens. Se fossem assados, não sobreviviam as células vegetativas; e, se os perus fossem desossados após 1 hora, juntados a molho e tudo posto numa geladeira, os esporos germinavam e as células multiplicavam-se durante 7 a 9 horas, quando as temperaturas eram de 50° a 15,5°C.

Quanto ao descongelamento de frangos de 1 kg de peso, aproximadamente, à temperatura ambiente (15° - 21°C), verificou-se que eram necessárias 3 horas para cada 454 g da carne, quando era mantida em saco de polietileno; e 2 horas para cada 454 g, quando este era removido. Todavia se, logo que fosse possível, se retirassem miúdos de dentro do frango, havia uma diminuição de meia hora nos dois casos e, nestas condições, não havia aumento das contagens de C. perfringens (137). Se o descongelamento era em refrigerador (4°C), eram necessárias 8 horas por 454 gramas, quer o frango estivesse acondicionado em saco de polietileno ou não; mas a ausência desse envoltório provocava desidratação da pele. No descongelamento sob água corrente, dentro dos sacos, era necessária 1 a 2 horas, por cada 454 g de peso.

Se se assam frangos em máquinas rotativas, a 149°C, durante 25 a 30 minutos por cada 454 g da ave, ou a 204°C, durante 20 a 25 minutos, também por cada 454 g, e se o descongelamento prévio tiver sido completo, sobrevivem formas resistentes ao calor de C. perfringens; mas, se o frango não tiver sido convenientemente descongelado ou não tiver sido bem passado, até Salmonella pode sobreviver (137).

Em 1975, nos Estados Unidos da América do Norte, foram realizadas experiências simulando-se as condições de preparação e ven

da usual de coxas de galinhas, com aproximadamente 80 - 120 g, com uma espessura máxima de 30 mm, e de peitos de 120 a 160 g, com a espessura máxima de 36 mm. Estes foram inoculados e postos em água quente a 82°C, por 20 - 50 minutos, e a 93°C, por 15 a 45 minutos, o que produziu uma temperatura interna de, pelo menos, 77°C (29). Neste caso, as células vegetativas eram todas destruídas e os esporos sensíveis ao calor desciam a níveis baixos— 0,3% nos peitos e 5,5% nas coxas—, ao fim de 43 minutos a 82°C; ou a níveis de 0,04% nos peitos e 0,2% nas coxas, ao fim de 45 minutos a 93°C. Todavia, os esporos resistentes ao calor permaneciam quase com a mesma população, a 82°C; e sofriam uma redução de 40 a 60%, quando a 93°C.

O subsequente congelamento, que costumam fazer, por 1 a 4 semanas, a - 23°C, provocou uma queda acentuada do número de esporos resistentes ao calor e, reaquecendo-se, posteriormente, em forno de calor seco, a 191°C, por 30 minutos (o que levou a uma temperatura interna de 71°C aproximadamente), só subsistiram 11 - 17% dos esporos resistentes ao calor, que eram contidos nas peças sujeitas a 82°C; e 0,6 a 2,6% das que eram sujeitas às temperaturas de 93°C, durante 45 minutos.

Em coxas contaminadas superficialmente, depois fritas à milanesa, congeladas e, finalmente, reaquecidas, observou-se o seguinte: ainda permaneciam com algumas células vegetativas de C. perfringens (0,1 a 1%) e esporos resistentes ao calor (1,6 a 8,1%), mesmo depois de fritas; depois do congelamento por 1 a 4 semanas, as células vegetativas reduziram-se (0,04 a 0,1%), assim como os esporos (0,5 a 5,5%). Depois do reaquecimento a 192°C, por 30 minutos, que produziu uma temperatura interna de 77°C, as células vegetativas só puderam ser detectadas por técnica de enriquecimento; e os

esporos, somente a níveis de 0,02 a 1,0% (29). A efetividade da fritura também foi estudada em outra experiência. Verificou-se que carne fresca ainda mostrava sobrevivência de células vegetativas de C. perfringens, depois de uma fritura de 12 a 15 minutos, enquanto que, por cocção, eram destruídas ao fim de 1 hora (90).

WOODBURN & KIM (192) inocularam duas estirpes resistentes ao calor e uma não resistente, em dois tipos de recheios de perus: um, seco, composto de pão, margarina, cebola, sal e pimenta; e outro recheio, úmido, contendo água.

Antes de serem cozinhados, os perus, já recheados, ficaram 24 horas na geladeira, tendo-se verificado que as células vegetativas reduziam-se a níveis muito baixos, enquanto o inóculo de esporos não sofria modificação. Assando-os num forno a 94°C, até atingirem 73°C no centro, e a 163°C e 232°C, até atingirem 82°C no centro, o inóculo de esporos da estirpe não resistente ao calor pôde ser recuperado às citadas temperaturas; armazenando-os, havia aumento das contagens após 24 horas a 23°C.

Oito anos depois, em 1974, BRYAN et al. retomavam semelhantes estudos, com perus pesando cerca de 9 kg (18). Quanto ao descongelamento em refrigerador, consideravam-no impraticável em grandes restaurantes, porque demorava vários dias; mas à temperatura ambiente, dentro de sacos plásticos, os perus atingiam 0°C, em 9 horas, e + 10°C, em 18 h, enquanto que à superfície atingiam 10°C, em 5 horas, e permaneciam a 16,6°C até ao fim do descongelamento de todo o peru. Desta forma, não havia possibilidade de multiplicação das bactérias, a não ser que o descongelamento se fizesse sem o saco plástico, o que permitiria o crescimento de psicotróficos.

Assando os perus inteiros, a 325°C, as partes mais espessas

demoravam muito tempo a atingir 73,8°C (cerca de 3 horas). Na superfície externa do peru, em menos de uma hora, eram exterminadas as formas vegetativas, subsistindo, entretanto, as que se encontravam na superfície interna das cavidades abdominais e torácicas.

O resfriamento em forno t \acute{e} pido consideravam desaconselhável, porque havia partes do peru que ficavam mais de 11 horas à temperatura de desenvolvimento das bactérias. Aconselhavam que os perus fossem cortados em fatias, colocadas em recipientes, os quais se deviam dispor dentro de outros que contivessem gelo, o que permitiria que as fatias atingissem a temperatura de 21°C em 1 hora. Se, depois, fossem deslocadas para uma geladeira, em 3 horas atingiriam uma temperatura abaixo da de multiplicação. Consideravam também segura a imersão dos perus, em duplo saco de plástico, diretamente no gelo.

Em outra experiência, a massa para salsichas também foi inoculada com esporos de células vegetativas de estirpes resistentes e não resistentes ao calor; e, em seguida, pasteurizada, para o centro geométrico atingir 68°C a 69°C, o que acontecia ao fim de 38 a 48 minutos. A massa foi posteriormente esfriada a 21°C, o que reduzia a temperatura para 49°C, ao fim de 10 - 15 minutos (160). Verificou-se que o processamento destruía só 10% dos microrganismos totais anaeróbios e 43% dos aeróbios, cujo crescimento se dá a 37°C; e que, dos microrganismos que crescem a 23°C, eram destruídos 99,2% e 95,6%, respectivamente.

De início, o número de C. perfringens não é dominante entre os anaeróbios (10%), mas, durante o armazenamento, aquele microrganismo, mesmo a 12°C, eleva-se de 10^3 para 10^6 em 5 dias; a 15°C, em 3 dias; e mais ainda a 37°C, tornando-se dominante entre os

anaeróbios. Não havia crescimento em 2 semanas, a 10°C, e em 4 semanas, de 0 a - 5°C.

1.2.11.2. Prevenção

Não obstante os muitos estudos de que tem sido objeto o C. perfringens nos últimos dez anos, a classificação das fontes de infecção feita em 1952 parece ter ainda validade. De acordo com esta classificação, os alimentos podem ser contaminados por duas vias (81): 1) via humana — pelas mãos dos cozinheiros, açougueiros e demais pessoal que manipula os alimentos; 2) via animal — por invadirem os músculos microrganismos oriundos do intestino (em vida ou após o abate), das fezes do chão, bem como dos ratos e de outros seres.

Evidenciou-se que a maioria dos surtos de toxi-infecção alimentar tem ocorrido, por a carne contaminada ser cozida a uma temperatura que permita a sobrevivência de formas vegetativas ou de esporos, que se multiplicam durante o tempo de resfriamento (78). Sendo este resfriamento geralmente lento e considerando-se que, principalmente depois da remoção do oxigênio pelo aquecimento, o Eh permanece baixo, aparecem condições de anaerobiose adequadas para o microrganismo, bem como nutricionais. A contaminação também se pode dar depois de ser cozinhado o alimento, mas, neste caso, de imediato, há menos condições anaeróbias para o desenvolvimento do germe (78); todavia, mais tarde, em virtude da possibilidade de se enrolar a carne ou de se misturar e sobrepor em camadas, podem surgir razoáveis condições de anaerobiose e também adequadas temperaturas, se o resfriamento for demorado, o que é provável,

se existirem volumosas massas de carne.

Com base nestes conceitos fundamentais, puderam ser estudadas as condições de obtenção, processamento e armazenagem, para diversos alimentos e para diversas fases da vida do alimento, e foram estabelecidas as normas de prevenção da doença.

BETTY HOBBS, em 1965, observava que nunca ocorria a intoxicação pelo C. perfringens, se o alimento fosse ingerido logo após ser cozinhado (78). Se as carnes de vaca ou porco devem ser servidas frias, o ar frio deve circular, durante uma hora e meia, pelos lados e por baixo da carne, que deve ser imediatamente refrigerada, em pedaços que não excedam 2,700 kg (78, 186). Se a carne é para ser servida quente, deve-se comê-la dentro de uma hora após cozinhada ou deixá-la sempre a mais de 60°C (78). Peças grandes ou muitas peças pequenas, compactamente acondicionadas no frio, podem demorar a recebê-lo na parte mais interna (82).

As precauções que se apontaram também foram mantidas para perus, nas instruções de BRYAN et al., em 1971 (19), mas, então, dados os conhecimentos dessa época, estes autores recomendavam que, se não se consumissem logo depois de assados, o resfriamento deveria ir a +10°C pelo menos, com o molho resfriando-se separadamente; o reaquecimento, quando se desejasse consumir quente, deveria ir, no mínimo, até 73,9°C no centro do alimento. No que diz respeito ao manuseio, recomendavam que fosse feito com luvas e, quanto ao resfriamento, que fosse feito em água corrente fria, banho de gelo, agitação contínua ou num congelador, durante 1 hora, e depois em refrigerador, usando-se recipientes baixos, limpos e higienizados, contendo pouco alimento, a fim de facilitar transferência térmica.

Acrescentavam os mesmos autores, em 1974 (18), que o descongelamento deveria ser completo, feito em saco de plástico (à temperatura ambiente, durante 1 hora, para cada 454 g de peru, ou 1 hora e 1/4, se são usados dois sacos), e que a temperatura para assar deveria ser, pelo menos, 162,7°C, para que o centro geométrico não atingisse menos de 73,9°C. Repetiam, portanto, o que já dissera BETTY HOBBS em 1952, ou seja: não se esfriar em forno tépido, mas sim reduzir o volume do assado, nas condições de refrigeração antes citadas; não empilhar os produtos mais de sete centímetros; não armazenar grandes quantidades de molho junto com o peru; ferver o molho antes de servir; e nunca manusear os perus assados, depois de manuseá-los crus, sem lavar as mãos.

DIANE ROBERTS (137), em 1972, preconizava que as estufas usadas, para manter frangos assados em temperaturas quentes, deveriam estar suficientemente quentes para prevenir a multiplicação dos microrganismos; que os frangos cozinhados deveriam ser esfriados rapidamente antes de se porem na geladeira e preferivelmente trinchados só na hora de serem servidos, não se limpando com papéis nem panos. A crítica que se aponta, no Brasil, aos aquecimentos a temperaturas altas, nas estufas, também foi expressa por BERRY JR. (14), em 1975, ao afirmar que estufas a 60°C tornam os produtos indesejáveis, ressecando-os. Observa o autor que isso se deve ao uso de equipamentos impróprios, nos quais, às vezes, há diferenças grandes de temperaturas, de acordo com o local do aparelho, e mesmo variações, de acordo com a composição dos produtos comestíveis (28). Mantendo-se produtos a 70-82°C, ao fim de 1 h já se notará, pelo gosto, uma redução da qualidade; e, ao fim de 2-3 horas, o alimento será inaceitável (64).

HALBINGER (57), dizendo que é necessário educar o consumidor e o produtor, para que se aceitem preços razoáveis por alimentos higiênicos, indica com isto a principal meta a atingir. É também necessário que o industrial se conscientize da importância dos exames microbiológicos, cuja necessidade é encarecida, com o exemplo de um surto ocorrido na Alemanha, cuja fonte era um tubo de aço com um defeito numa conexão, que permitia a contaminação constante da emulsão para salsicha (44).

Há necessidade urgente de informações acerca da segurança microbiológica de alimentos pré-cozidos, prontos para servir mais tarde, pois são mais importantes, em termos de perigo à saúde pública, que quaisquer outros tipos de alimentos (177). Isto sucede, proque há um período muitas vezes longo entre a preparação culinária e o consumo e os alimentos assim fabricados, em regra, destinam-se a um largo número de pessoas (177).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

O material base deste trabalho é constituído de 299 amostras de alimentos, colhidas entre 18/2/75 e 14/11/75.

Propositadamente, a coleta foi sempre deixada a cargo do próprio comerciante, com os seus cuidados comuns: uso de sua faca, de pegador ou das mãos (conforme seu hábito), uso de seu papel, a fim de se obterem dados os mais fiéis possíveis das condições de revenda.

As 50 amostras de carne bovina moída (entendendo-se, no presente trabalho, por carne bovina, o macho e fêmea, adultos, de Bos taurus LINNAEUS, 1758) foram obtidas em diversos açougues, de 41 máquinas moedoras, colhendo-se a carne nelas contida.

As 50 amostras de carne suína (Sus scrofa LINNAEUS, 1758, machos e fêmeas adultos) foram obtidas de 39 locais de venda, tendo sido extraídas fatias de mais ou menos 0,5 cm de espessura, junto dos ossos da bacia, na parte do músculo reto-medial da coxa ou gracilis, que é cortado pela serra, quando, no matadouro, se separam os dois traseiros.

As 52 amostras de carne de aves (Gallus gallus LINNAEUS, 1758, machos e fêmeas, de 60 dias aproximadamente) foram colhidas de 12 estabelecimentos da cidade, que fazem o recorte das aves para venda no local. São duas amostras destas aves foram colhidas por dia, retiradas da ponta do peito, num corte que interessava a cartilagem xifóide, parte da porção caudal do peitoral superficial e parte do músculo oblíquo abdominal externo.

As 50 corvinas (Micropogon spp.) foram trazidas em peças inteiras, duas por dia; no laboratório, eram tiradas amostras da parte posterior aos opérculos, num corte que interessava escamas, pele, músculos e tecidos anexos, sem atingir as vísceras.

As 35 lingüiças frescas e 31 salsichas foram colhidas, em peças inteiras, de 30 e 29 estabelecimentos varejistas, respectivamente.

As 31 coxinhas de galinha foram obtidas em 30 bares, dentro de estufas que mantêm os produtos quentes.

Através desses estabelecimentos visitados, no centro e bairros da cidade, procurou-se obter uma amostragem que representasse as condições gerais da cidade, na venda a retalho.

O principal equipamento por nós utilizado, adaptado às nossas condições de trabalho, constou do que a seguir se expõe.

Homogeneizador construído com uma máquina furadora da marca "Craftsman", de 2.600 r.p.m., suspensa numa armação de ferro que lhe permite descensão e ascensão, para acoplar o conjunto eixo - facas - copo de homogeneização (Fig. 2, p. 77). O eixo, por um lado, fixa-se à máquina e, por outro, contém duas facas duplas, iguais às dos liquidificadores comuns. O copo foi construído de uma panela de alumínio, com quatro reentrâncias da altura do copo, equidistantes — os deflectores —, na medida-padrão. A tampa foi recurvada à volta, para se adaptar, por meio de uma borracha de corte transversal em U, à panela. (O conjunto copo-eixo - facas permite esterilização em autoclave. O calor e umidade asseguram a destruição de esporos e bactérias (3).

Jarra anaeróbia, construída de um recipiente de plástico rígido, marca Permution, a cuja tampa se adaptaram duas torneiras das

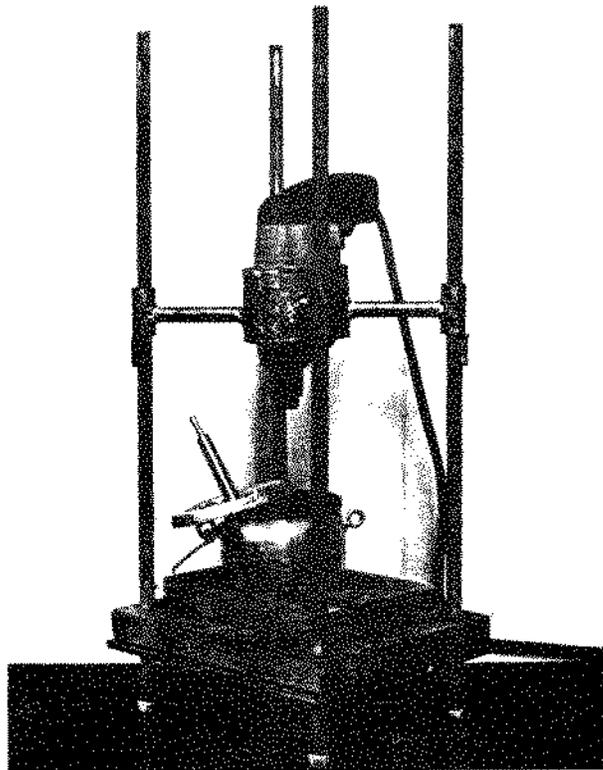


Fig.2. - Homogeneizador de amostras

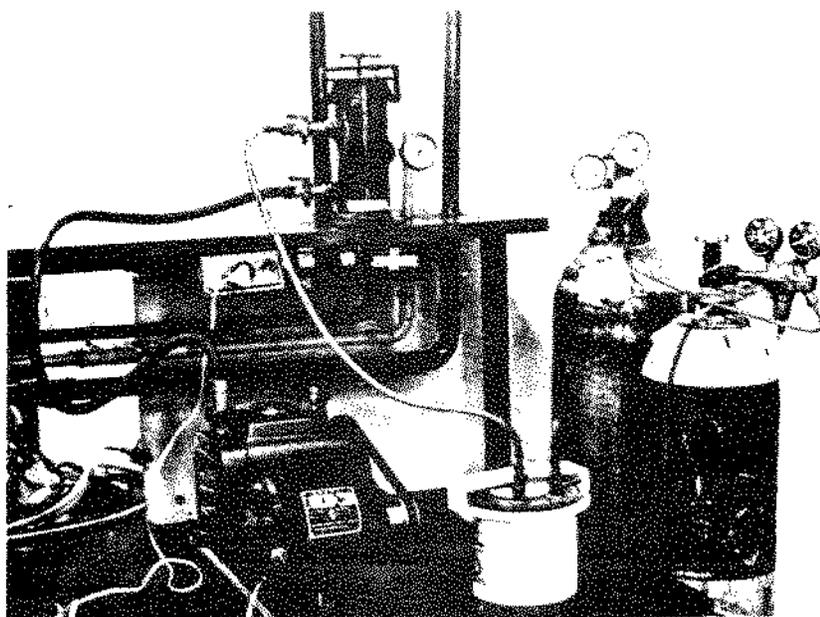


Fig.3. - Bomba de vácuo, vacuômetro, jarra anaerôbia e cilindro de gases.

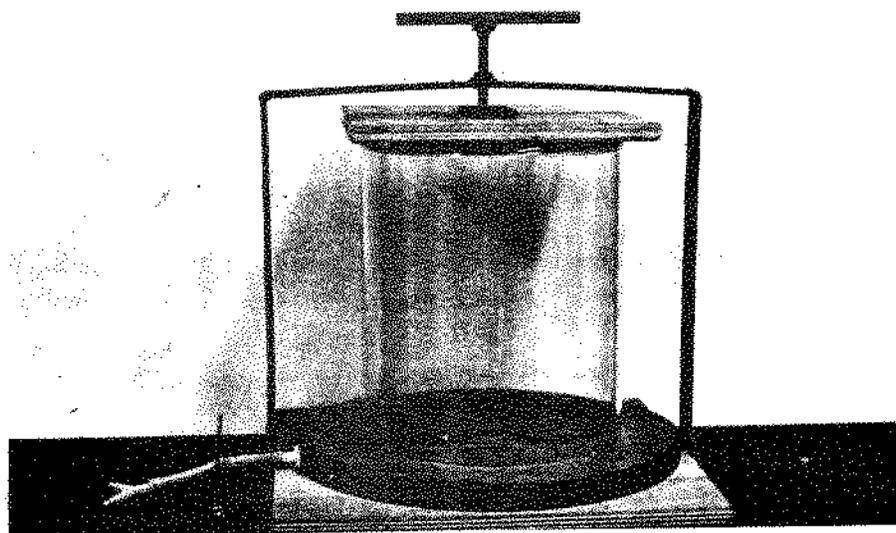


Fig.4. - Jarra anaerôbia.

usadas em instalações de gás; uma destinada à tubulação de borracha para vácuo; e outra, a idêntica tubulação para nitrogênio e anidrido carbônico (Fig. 3, p. 78).

Jarra anaeróbia, feita de uma câmara de vácuo "nalgene", de quatro litros de capacidade, aproximadamente. Por cima e por baixo do corpo da jarra, adaptaram-se dois quadrados de madeira, que, apertados com um grampo, firmam o conjunto (Fig. 4, p. 78).

Vacuômetro, marca Record, com escala em polegadas de mercúrio (Fig. 3, p. 78).

Além deste equipamento, foram ainda utilizados: estufa a vácuo, marca Fanem; bomba de vácuo de 1/3 de C.V. (Fig. 3, p. 78); estufas comuns; banhos-maria, marca Fabbe; cilindros de aço fornecedores de nitrogênio U e anidrido carbônico (Fig. 3, p. 78); balança, marca Mettler, P 1.000 d = 0,1 g; contador de colônias, marca Hellige; tubos de vidro de "pyrex", marca Corning, de 16 x 150 mm, com tampa rosqueável; pipetas, com chupetas adaptadas, e de mais material de uso em laboratório.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Para Exame de Alimentos

O transporte das amostras para o laboratório era feito imediatamente após coleta, decorrendo, no máximo, 1 hora e meia entre a coleta e o início dos exames.

Fora a carne bovina, que já vinha moída, os restantes alimentos eram cortados (as lingüiças e salsichas, incluindo a parte exterior), de forma a se extraírem amostras de 20 gramas de cada alimento. Uma coxinha de galinha era aberta, sendo pesada toda a

carne e parte da batata, para perfazer 20 gramas.

Esse peso da amostra era homogeneizado com 80 ml de solução de Ringer, a um quarto de concentração, a qual estava contida nos copos de homogeneização, submetendo-se, em seguida, o conjunto a uma desintegração durante 3 minutos (7.800 rotações p. m.).

Para exame do material, diluições do homogeneizado foram espalhadas com espátula de Drigalski sobre placas em duplicata de ágar-sangue com neomicina (AS + Neo, anexo 1); outras diluições foram aquecidas a 80°C, durante 10 minutos, repetindo-se a mesma operação sobre placas em duplicata. Esses dois pares de placas se destinavam à incubação em anaerobiose; o mesmo se fazia sobre uma outra placa, para incubação em aerobiose (quadro VI, p.81). Para o exame dos microrganismos resistentes ao calor, o homogeneizado era inoculado em caldo de carne cozida —C.C.C.— (anexo 2) contido em tubo de "pyrex" com tampa rosqueável e este era aquecido à temperatura de ebulição, por 60 minutos, e depois esfriado. Também, antes da inoculação, o tubo de C.C.C. era aquecido 10 minutos em banho-maria e depois esfriado.

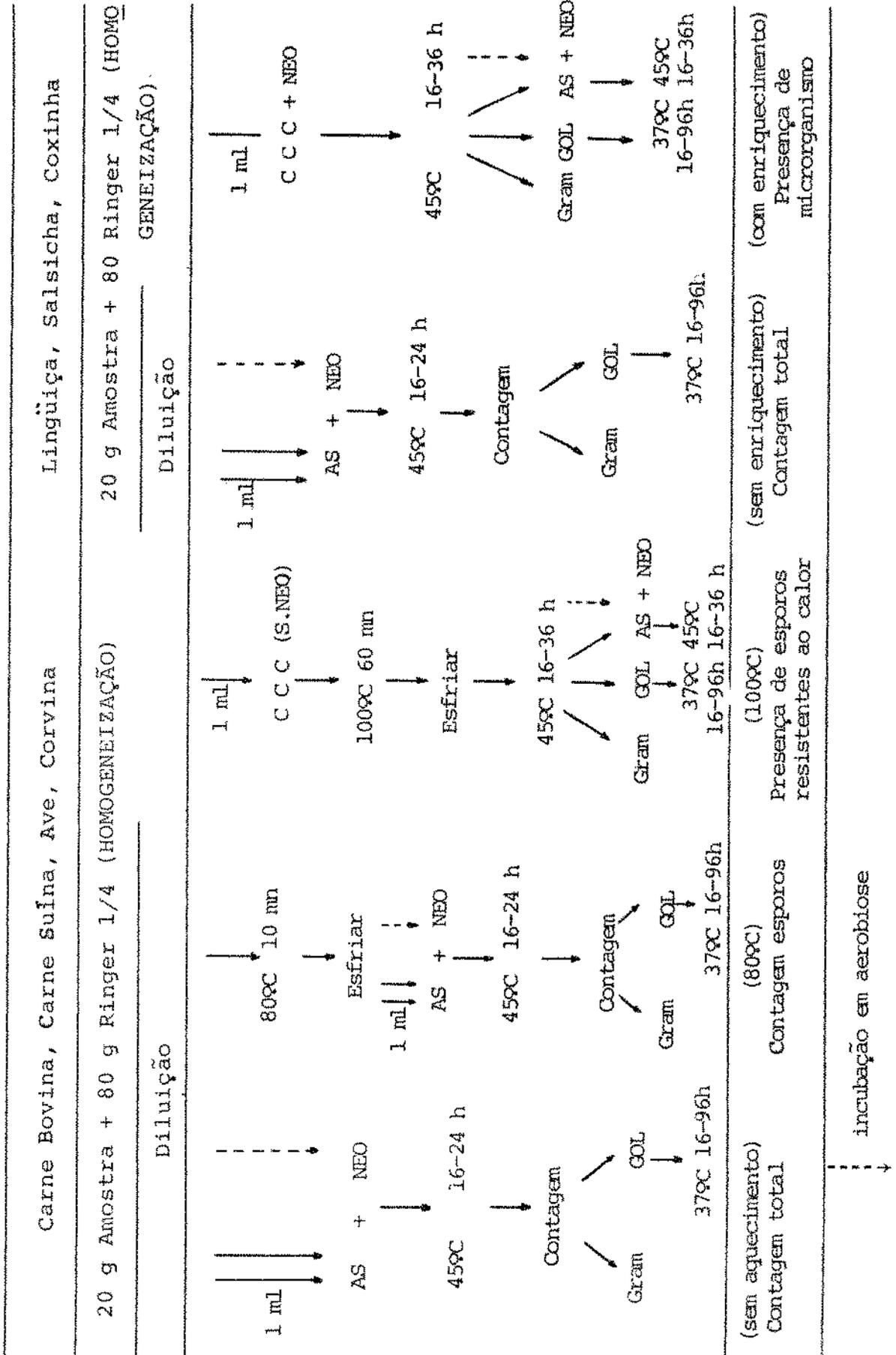
A confirmação das colônias era feita pelo Gram, e uso de gema de ovo - lactose (GOL) (anexo 3).

Para produtos já elaborados, não houve aquecimento (quadro VI, p. 81).

Antes das placas serem inoculadas, aqueciam-se a 37°C, durante 20 minutos, e espalhavam-se 0,6 ml de sulfato de neomicina, por toda a superfície da placa de ágar-sangue, ou 0,6 ml de antitoxina do laboratório Wellcome ("Sera for the identification of Clostridia, C. Welchii type A"), por meia placa de GOL, usando-se, para tal, espátula de Drigalski.

QUADRO VI

ESQUEMA DO MÉTODO DE ANÁLISE DOS ALIMENTOS



As placas, depois de inoculadas, eram colocadas nas jarras ou na estufa FANEM, com a tampa para cima, e realizava-se o vácuo de 24 polegadas, substituindo-se o ar por 90% de nitrogênio e 10% de anidrido carbônico. A exaustão e a inoculação destes gases era repetida por quatro vezes seguidas.

A incubação das placas de ágar-sangue ou de caldo de carne cozida era a $45^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e as de gema de ovo - lactose, a $37,3^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

2.2.2. Para Exame do Surto

Tomando conhecimento dos sintomas de doença apresentados por algumas pessoas que haviam almoçado num restaurante, elaborou-se imediatamente um questionário (anexo 4) que foi distribuído a 23 pessoas, umas que não ficaram doentes e outras que ficaram doentes em consequência desse almoço. Estas pessoas eram de nível de instrução muito bom e as suas respostas são de boa credibilidade.

Robustecida a nossa hipótese de se tratar de intoxicação por C. perfringens, distribuimos indistintamente, no dia seguinte, o mesmo questionário, no refeitório, para 83 pessoas, que já tinham um visível menor grau de instrução. Como da primeira vez, não houve entrevista.

As fezes de 11 pessoas que adoeceram foram colhidas em placas de Petri esterilizadas, após 2 - 3 dias do aparecimento da doença, e postas em geladeira até ao exame, que ocorreu logo que foram recebidas todas as amostras.

Com solução de Ringer a um quarto de concentração, homogeneizou-se 1 grama de cada amostra (exceto uma que não perfazia esse

peso) e sujeitou-se o conjunto à temperatura de 80°C, por 10 minutos. Depois de feitas as diluições, espalhou-se 1 ml sobre cada uma de duas placas de ágar-sangue e confirmaram-se as colônias, da mesma forma como para alimentos.

2.2.3. Para avaliação da nova modificação do meio de WILLIS & HOBBS

Foram usadas seis placas de GOL, preparadas conforme preconizaram WILLIS & HOBBS, em 1958 (188); seis placas, preparadas com GOL, modificado por HALL et al., em 1969 (61), e igual número de placas do meio que ora se apresenta, formulação igual ao meio de W.H., mas acrescentada de 0,45% de extrato de levedura, de 0,5% de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, de 0,1% de tioglicolato de sódio e de 1,5% de proteose - peptona.

Todas as placas foram preparadas no mesmo dia e, antes da inoculação, foi espalhada antitoxina de C. perfringens, tipo A (0,06 ml.), em metade de cada uma.

Em cada placa foram feitas quatro estrias, cada uma para uma das quatro culturas usadas: C, proveniente dos USA e fornecida pelo Dr. H. Riemann; III, proveniente do surto que relatamos; 64, coletada por nós de carne de porco; e a 246, coletada, também por nós, de corvina.

Antecipadamente, de 24 em 24 horas, e durante 4 dias pelo menos, as culturas eram transferidas de meios de carne cozida para outros iguais. Todas as placas foram incubadas na mesma estufa, em anaerobiose, e à temperatura de $37,3^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Finda essa incubação, formaram-se três grupos de placas, cada um com duas de cada meio: um grupo manteve-se em incubação

anaeróbia; outro, depois de 24 horas de incubação anaeróbia , foi colocado em geladeira, à temperatura de $5,8^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; e o último manteve-se à temperatura de $31,1^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, até ao fim da experiência.

De 24 em 24 horas, a partir da inoculação, as placas eram examinadas, medindo-se com um paquímetro a expansão do halo da lecitinase formado para o lado do limite das estrias, avaliando-se a intensidade da coloração do halo, a coloração das colônias das estrias e a coloração do meio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. DO EXAME DOS ALIMENTOS

A homogeneização, em solução de Ringer, de 20 g de amostra em 80 ml da solução (P/V), permitiu uma diluição inicial a 1/5 e, conseqüentemente, a inoculação das placas de ágar-sangue com 1 ml desta diluição só oferece possibilidades matemáticas de encontrar mos C. perfringens, quando a população microbiana é maior ou igual a 5 em 1 grama do alimento.

Tal diluição, por ser demasiadamente espessa, tornou difícil succionar com a pipeta a fração do homogeneizado para a semeadura, o que é contornado pela continuada prática.

A opção que se faz pelo ágar-sangue, para o isolamento do C. perfringens, decorreu do fato do meio S.F.P. não nos ter parecido satisfatório. Esse meio, surgido quando iniciamos este trabalho em 1971, denunciou-se-nos falho na apresentação da reação da lecitinase. Até mesmo em culturas sabidamente puras de C. perfringens, algumas das colônias não apresentavam o halo opalescente característico da reação de lecitinase, enquanto outras o apresentavam na mesma placa.

Por outro lado, a prova sobre meio de lactose-motilidade (L.M.), que é subseqüente à inoculação em S.F.P., somente é satisfatória, se correlacionada com o gram, mas também requer certa experiência e treinamento por parte do técnico. Neste meio, não há dificuldade em interpretar a reação de fermentação da lactose, mas o mesmo não sucede quanto à motilidade. Depois da inoculação do germe na profundidade do meio, não ocorre qualquer crescimento para os lados da

estria da inoculação, se se tratar de C. perfringens. Acontece, todavia, que, devido à produção de gás, observa-se geralmente o arraste de células que param no meio, fora da estria de inoculação, dando a falsa idéia de mobilidade do germe. Dever-se-á distinguir, pois, se as colônias dispersas o são pelo arraste do gás da fermentação. Também o investigador deverá sempre levar em consideração se a mobilidade ao longo da estria de inoculação será devida a uma possível contaminação da colônia em observação.

O não aparecimento da reação de lecitinase à volta de uma colônia, ainda no meio de S.F.P., pode levar à conclusão de não se estar na presença de C. perfringens, quando na verdade pode ser o microrganismo que nos interessa, que não dá a reação devido à pouca sensibilidade do meio de cultura.

É certo que o método do ágar-sangue é também complementado pela prova da lecitinase, mas esta só entra no trabalho, quando já há dados que nos fortalecem a idéia de estarmos ou não na presença de C. perfringens. Quer isto dizer que, quando se está na provável presença do microrganismo, dada a importância desta prova, há que insistir na obtenção da reação de lecitinase, reativando o microrganismo ou enriquecendo a cultura que provavelmente o contém.

Considerando que esta reação no meio de GOL (WILLIS & HCBBS, 1958), usada na comprovação de colônias em A-S., não se mostrava suficientemente sensível, inoculávamos também o meio de L.M. (como originalmente foi proposto para o de S.F.P.), sem valor decisório, mas que, quando positivo, nos sugeria a necessidade de insistência sobre o considerado meio de GOL, para se tentar conseguir neste as propriedades do C. perfringens.

O fato de nos interessarmos por saber alguma coisa sobre a

existência de esporos resistentes ao calor, considerando sua importância higiênica, nos levou a incluir esta investigação no exame da matéria-prima, onde era de se prever que existiriam.

O enriquecimento das amostras em produtos elaborados, sem a contagem do número de bactérias, foi incluído na pesquisa, porque, se bem que a intoxicação humana só se dê quando o número dos microrganismos é elevado, a existência num alimento supera, em interesse higiênico, o conhecimento do seu número.

Durante o desenrolar de nossos ensaios, não se fez só uma exaustão de ar, como sugeriu A.T. WILLIS, mas quatro exaustões sucessivas, como conseqüência das nossas condições particulares de trabalho. A estufa a vácuo, embora vede bem neste tipo de trabalho, não é perfeita quando a pressão negativa não funciona de dentro da tampa, apertando esta contra o corpo do aparelho, e, às vezes, por isso, entra ar. As jarras também não denotam uma vedação perfeita na tampa ou nas torneiras. Por estes fatos, a experiência mostrou-nos que uma única exaustão não era suficiente e que as quatro exaustões sucessivas compensavam as falhas apontadas.

O uso do nitrogênio comercial ou industrial (na substituição do ar), para obter a anaerobiose, foi causa de perda de muitas amostras, de material de laboratório, repicagens e tempo, devido à falta de crescimento do microrganismo. Depois deste insucesso, mudamos para o nitrogênio "U" e tivemos êxito com este tipo de gás. Posteriormente, conseguimos descobrir como os gases se revelaram aos exames feitos fora das indústrias produtoras. A bula duma casa fornecedora de gás, afiança como sendo de 99,95% a pureza do nitrogênio designado por R (com $O_2 \leq 10$ VPM), a do nitrogênio U de 99,9995 (com impurezas de $O_2 \leq 5$ VPM) e a do nitrogênio designado

por comercial não seria muito diferente da do R. A realidade, porém, é que, neste tipo de gás comercial, o oxigênio muitas vezes chega a 2% e o argônio a 1%, havendo variações de remessa para remessa, até chegar, em certos casos, a 20% e mais de O_2^* . Porém o nitrogênio U ou S8 apresentou, comprovadamente, uma pureza de 99,99%.

No quadro VII, p. 89, procuramos sintetizar parte dos resultados dos exames por nós feitos sobre 299 amostras de alimentos das 574 estudadas. Excluimos 275 amostras, que usamos no estudo preliminar, para testagem das jarras e estufas anaeróbias, inibições de crescimento ocorridas como consequência de uso de gás que desconhecíamos conter muito oxigênio, mesmas inibições pelo uso duma neomicina que nos foi fornecida, estudo da quantidade de alimento a homogeneizar com a solução de Ringer, tentativas de melhorar a reação de lecitinase, testagem de tubos de vidro com rosca, etc.

O mesmo quadro, além de mostrar a frequência de amostras positivas para os diferentes alimentos e a sua percentagem ao nível de 95% de confiança, esclarece quando se usou enriquecimento, se se realizou aquecimento das amostras ou não e qual a temperatura de aquecimento.

O processo que nós usamos para o tratamento das amostras de matérias-primas (com temperaturas variáveis e às vezes com enriquecimento) não foi usado até hoje, que saibamos, para exame de alimentos, mas o foi para fezes. Nós o fizemos na tentativa de obtermos conhecimento sobre a contaminação que esses produtos sofrem pelo homem, pelo ar e por outras formas. Usando-o, viríamos a saber

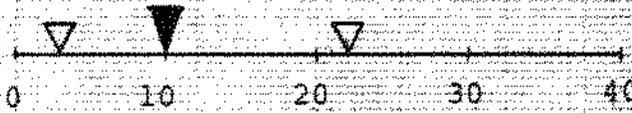
* Comunicação pessoal do Instituto de Física da UNICAMP.

QUADRO VII

INCIDÊNCIA DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS EM 299 AMOSTRAS DE ALIMENTOS

Produto	Enriquecimento	Tratamento térmico °C	Número de Amostras	Número Amostras Positivas	Percentagem ao nível 95% de confiança		
					Mínima	Média	máxima
Carne bovina (50 amostras)	Sem	Sem	50	5	3	10	22
	Sem	80	50	1	0	2	11
	Com	100	50	2	0	4	14
Carne suína (50 amostras)	Sem	Sem	50	10	10	20	34
	Sem	80	50	0	0	0	7
	Com	100	50	3	1	6	17
Frango (52 amostras)	Sem	sem	52	8	7	15	29
	Sem	80	52	0	0	0	7
	Com	100	52	1	0	2	11
Corvina (50 amostras)	Sem	Sem	50	2	0	4	14
	Sem	80	50	0	0	0	7
	Com	100	50	0	0	0	7
Salsicha (31 amostras)	Sem	Sem	31	1	0	3	17
	Com	Sem	31	2	1	6	22
Lingüiça fresca (35 amostras)	Sem	Sem	35	2	1	6	20
	Com	Sem	35	21	44	60	78
Coxinha de galinha (31 amostras)	Sem	Sem	31	1	0	3	17
	Com	Sem	31	2	1	6	22

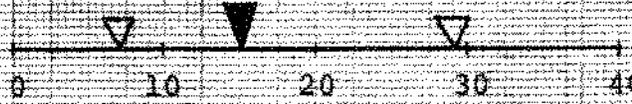
CARNE BOVINA



CARNE SUINA



FRANGO



CORVINA



FIGURA 5

Porcentagem de amostras de carne bovina, carne suína, frango e corvina, contendo Clostridium perfringens, sem enriquecimento e sem tratamento térmico, ao nível de confiança de 95%.

se há, entre nós, formas resistentes à fervura até 1 hora (sem cal
cularmos a sua população), utilizando o enriquecimento; com o trata
tamento térmico a 80°C por 10 minutos, sem enriquecimento, avaliari
amos a população de esporos termolábeis e termorresistentes, acima
de um nível de detecção de 5 ou mais microrganismos por grama;
usando a semeadura direta, sem tratamento térmico e sem enriquecimen
to, avaliaríamos, também acima do mesmo nível de detecção, a popu
lação total de formas vegetativas e esporuladas de C. perfrin
gens, que o processo permite evidenciar.

Da análise do citado quadro VII, p. 89, e da fig. 5, p. 90, com
referência à carne suína, frango, bovina e corvina, em inoculação
direta (sem tratamento térmico e sem enriquecimento), pode-se ver
que entre estas qualidades de alimentos, pela gradação citada, não
aparecem significativas diferenças estatísticas, sendo que a asso
ciação que existe entre positividade não é significativa para
dois graus de liberdade.

STRONG et al., em 1963, usando semeadura direta como nós, em
26 amostras de carne bovina, encontraram 16% positivas, o que dá
um intervalo de confiança de 5 a 37% (ao nível de 95% de confiança
ça). Tal dado é semelhante àquele por nós observado (3 a 22%). Os
mesmos autores, para 23 amostras de carne de porco, encontram 0 a
22% de intervalo de confiança e a média de 4%; e nós, 10 a 34% e
a média de 20%, o que demonstra que a nossa carne é mais contamina
da.

Os valores da percentagem média de HALL et al., para 50 amostras de carne bovina, foram de 70%, o que dá um intervalo de confiança de 56 a 82%, e, em 41 amostras de carne suína, foram de 37%, com um intervalo de confiança de 24 a 57%. São valores que não se podem comparar com os nossos, obtidos sem enriquecimento.

MILAV et al., para o conjunto de 500 amostras de carne bovina e suína, moída nas casas varejistas, e trabalhando em condições de inoculação semelhantes às nossas, obtiveram 33% de amostras positivas, o que dá um intervalo de confiança de 28 a 38%. A média por nós obtida, para a carne de vaca moída no varejo, somada com a suína em cortes, foi de 15%, à que corresponde um intervalo de confiança de 9 a 24%, portanto menor.

Os resultados de LADIGES et al., em 1974, para carne bovina semeada diretamente, são de 47,4% positivas em 95 amostras analisadas. O intervalo de confiança para estes dados é de 35 a 55%, o que é mais do que obtivemos (3 a 22%).

Os resultados de IENISTEA et al., também em 1974, revelam 10% de positivas em 20 amostras de carne suína analisadas, o que dá um intervalo de confiança entre 1 e 31%. Considerando que a sementeira foi direta e os resultados dos autores se referem a Clostridia de que faz parte o C. perfringens, há que deduzir que os nossos (10 a 34%), referentes sã à espécie citada, são mais altos.

A menor contaminação da corvina (Fig. 5, p. 90) pode-se atribuir a que aquele pescado provém do alto mar, sem contaminação de C. perfringens, não fica sujeito a tão grandes contaminações pelo ar até que chega ao porto, fica em porões de navios, em regra em

prateleiras com gelo, não foi colhido por nós no retalhista, mas no atacadista, o qual o mantinha ainda em gelo, e não sofreu qualquer incisão para evisceração.

Os resultados obtidos por INAL et al., em 1974, sobre 60 peixes, foram de 6,6% de amostras positivas, com um intervalo de confiança de 2% a 17%. Este resultado não tem significativa diferença do nosso (0 a 14%). Dentro do intervalo de confiança obtido por STRONG et al., 0 a 31%, referente a 11 amostras, em que não encontrou nenhuma positiva, cai o nosso de 0 a 14%, obtido sobre 50 amostras.

Os intervalos de confiança dos resultados obtidos por BUROW sobre 28 espécies são mais elevados que os nossos: 24 amostras de peixe vendido nas ruas tinham 29% de amostras positivas (intervalo de confiança de 13 a 49%), enquanto que sobre 70 amostras de peixe trazido de outra cidade, descongelado e lavado vez por outra, para dar aparência de fresco, a percentagem média de amostras contaminadas era de 20% (intervalo de confiança de 15 a 35%).

São resultados que não se podem comparar com os nossos, por serem de outras espécies de peixes e por apresentarem particulares condições de venda a retalho.

Esta dificuldade de se compararem os valores das freqüências de amostras positivas, em muitos casos, é também extensiva à carne de bovino, suíno e frango, se se quiserem comparar com outras amostras de outros locais. Além do estado de saúde dos animais (vide experiência de ZAGAEWSKII, p.41), desconhecem-se, muitas vezes, alguns ou todos os processos e etapas a que se sujeitaram os animais, até chegarem à forma de carne e até que esta tenha alcançado a mesa do consumidor: o descanso antes do abate e a duração dele (vide

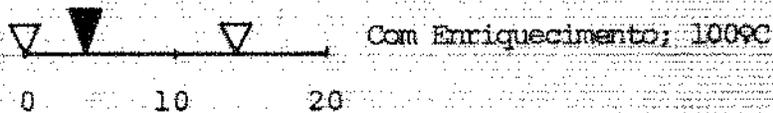
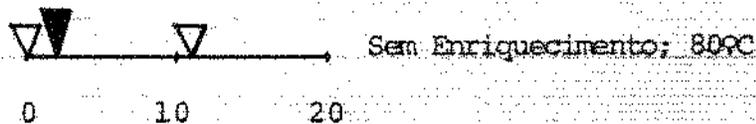
experiência de NARAYAN, p.41), a exigência da inspeção sanitária, as condições de evisceração e a sua rapidez, a conservação por congelamento (vide experiência de LADIGES et al., p.42) ou por refrigeração ou a venda de carne verde e a higiene do retalhista. A tudo ainda acresce o uso de métodos de exame não padronizados.

Nos exames que temos acabado de expor, quando realizamos a inoculação direta, sem aquecimento, fizemos a contagem das placas. A população de C. perfringens nas amostras positivas, em frango e corvina, revelou de 5 a 10 microrganismos por grama. Nas mesmas condições, em carne bovina, a população era maior: 2×10^2 ; 4×10^2 ; $5,2 \times 10^2$; $2,3 \times 10^3$; $1,2 \times 10^4$ por grama. Em carne de suíno houve: 3×10 ; $1,6 \times 10^3$; 2×10^3 ; $8,6 \times 10^3$; $1,9 \times 10^3$; $1,9 \times 10^3$; $7,4 \times 10^3$; $5,8 \times 10^4$; 5; 5 por grama.

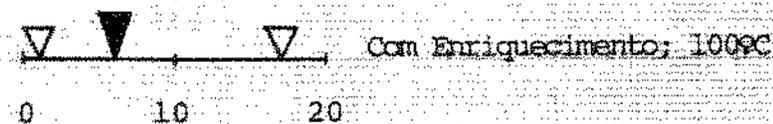
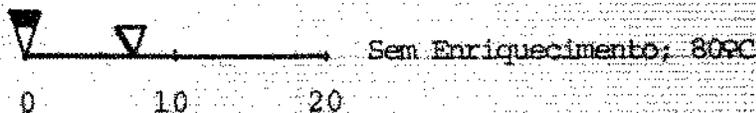
Se em outra análise do quadro VII (p. 89) e da figura 6 (p. 95), considerarmos o crescimento do C. perfringens nas amostras sem enriquecimento e sujeitas à temperatura de 80°C por 10 minutos (esporos termolábeis e termorresistentes), encontramos a frequência média de 2% em carne de bovino e 0% para a carne de suíno, frango e corvina. A amostra positiva de carne bovina tinha a população de 200/g.

Da análise do mesmo quadro e figura, se pode ver que, quando se usa enriquecimento e tratamento térmico a 100°C, a frequência das amostras positivas (esporos termorresistentes) é maior que a que encontramos para esporos termolábeis e termorresistentes em conjunto. Sucede isto porque, no caso destes dois últimos tipos de esporos (tratamento a 80°C), não se realizou o enriquecimento e, portanto, há amostras com uma população microbiana baixa (abaixo de 5/g), que aparecem como negativas, quando na verdade não o são.

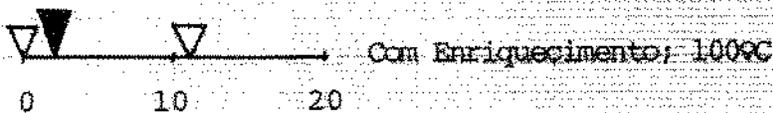
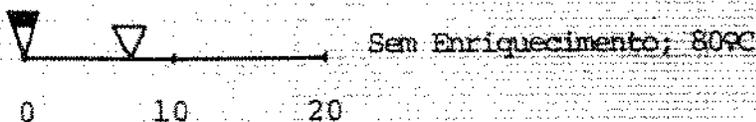
CARNE BOVINA



CARNE SUÍNA



FRANGO



CORVINA

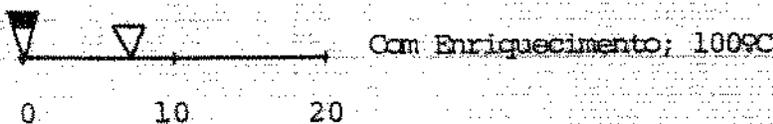
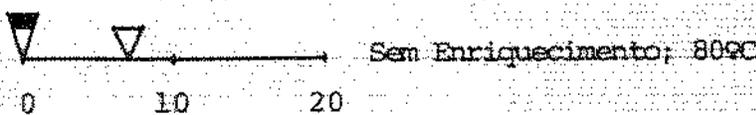


FIGURA 6

Percentagem de amostras de carne bovina, carne suína, frango e corvina, contendo Clostridium perfringens, ao nível de confiança de 95%, que não tiveram enriquecimento e foram aquecidas a 80°C por 10 min, e das que tiveram enriquecimento e foram aquecidas a 100°C por 1 h.

HALL et al., em 1964, em 108 estirpes isoladas de 262 amostras de carne bovina, suína e embutidos, encontraram só uma estirpe termorresistente e a literatura sempre cita que, em todos os países em que se tem estudado o microrganismo, as estirpes termosensíveis são em maior número que as termorresistentes. Se, como é natural, também no Brasil ocorrem mais estirpes termossensíveis que termorresistentes, há que admitir que a percentagem de amostras que, de fato, deverão conter microrganismos com as duas formas de resistência, é bem maior que o valor médio obtido para amostras enriquecidas e tratadas a 100°C (de 4% para carne bovina, 6% para suína, 2% para frango e 0% para corvina).

HOBBS, B.C. et al., em 1953, encontraram, com técnica de enriquecimento, 24% de amostras positivas para estirpes resistentes ao calor, em carne de vaca, e 20% em carne de suíno; mas, em 1959, HOBBS, B.C. & WILSON, J.G. já encontravam só 10,3% para suína e 4,3% para carne de vaca, números estes que não apresentam diferença significativa em relação àqueles por nós encontrados.

As salsichas, quando não se enriqueceram as amostras (figura 7, p. 97), ao nível de detecção de 5 ou mais, apresentaram uma amostra positiva ou 3% com a população de $1,9 \times 10^2$ /g. Com contagens inferiores a 5 (amostras sujeitas a enriquecimento), houve duas, ou seja, 6%.

Quanto às lingüiças frescas estudadas (quadro nº VII, p. 89 e fig. 7, p. 97), ao nível de detecção de 5 ou mais microrganismos por grama, só apareceram duas amostras positivas (6%), com contagens de 10 e de $1,5 \times 10^4$. Com enriquecimento das amostras (detecção abaixo de 5 por grama de amostra), encontramos 60% de amostras positivas.

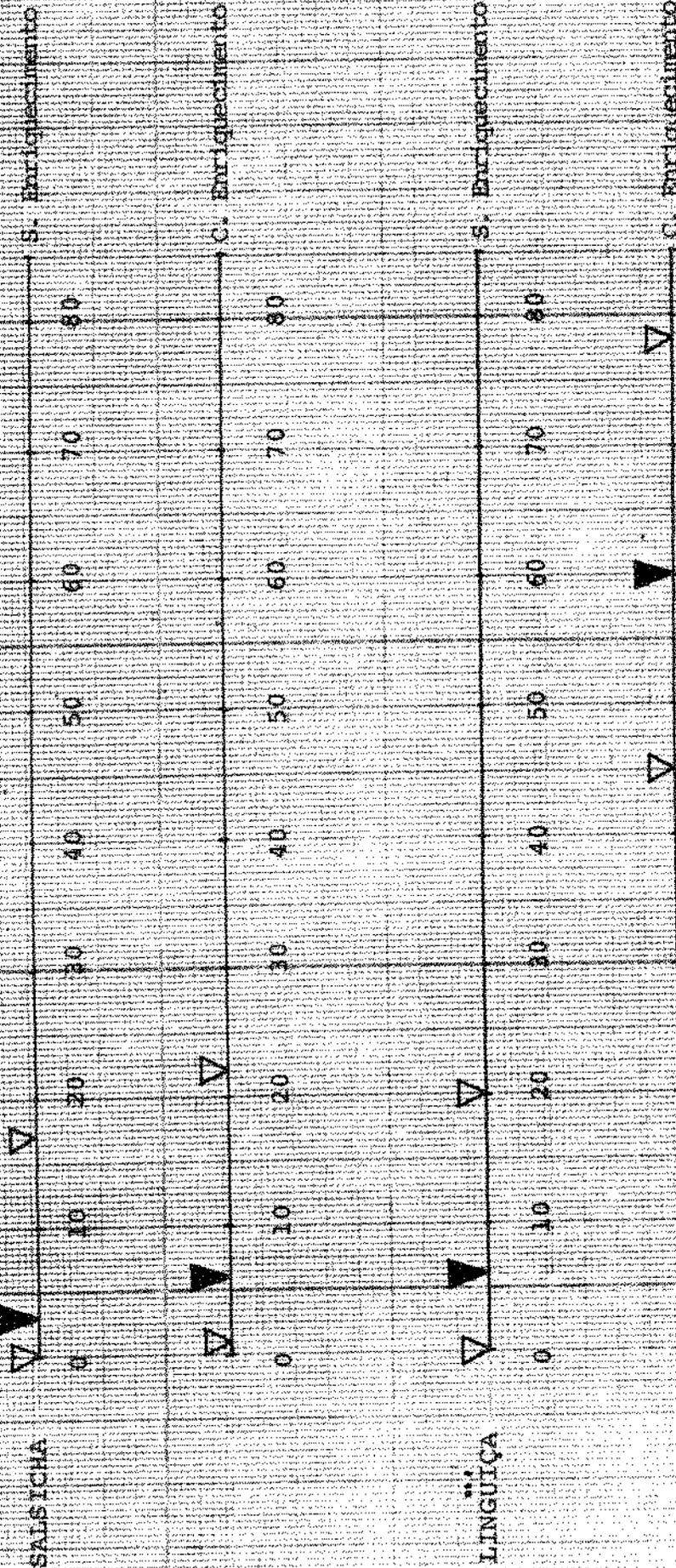


FIGURA 7

Percentagem de amostras de Linguica e Salsicha, sem tratamento térmico, com e sem enriquecimento.

Depreende-se destes fatos que as lingüiças são muito contami-
nadas por C. perfringens, mas que nelas preponderam populações mi-
crobianas baixas.

Há lógica no fato de a salsicha ter menos freqüência de amo-
stras, se se considerar que a salsicha sofre, durante a fabrica-
ção, uma pasteurização, ao passo que a lingüiça fresca não sofre
qualquer tratamento térmico, sendo comum ainda fabricar-se dos pio-
res pedaços de carne e de retalhos já com grandes contaminações.

Quanto às chamadas coxinhas de galinha, ao nível de detecção
de 5 microrganismos ou mais, só apareceu uma amostra (3%), com a
contagem de $2,4 \times 10^4$. Com menos de 5 microrganismos, apareceram
6% (figura 8, p. 99).

A menor freqüência de amostras positivas entre as coxinhas do
que na lingüiça é natural, pois a coxinha, na sua elaboração, con-
tou com o cozimento prévio da galinha e depois com uma fritura. Pa-
ra a baixa freqüência de amostras positivas, também concorre o fa-
to de todas as coxinhas terem menos de 20 gramas de carne e condi-
mentos, tendo havido necessidade de completar a carne com a batata
externa, que não é um bom meio para anaeróbios. A carne de frango
das coxinhas é tão pouca, que, num caso, só havia pouco molho e um
pedacinho de cebola e outro de salsa.

Pode-se admitir que, se as coxinhas tivessem 20 gramas de car-
ne, a freqüência de amostras positivas seria maior que a da salsi-
cha.

Não há diferença significativa entre os nossos dados de amo-
stras positivas de coxinhas de galinha, quando se faz enriquecimen-
to (6%), e os obtidos por LILLARD (2,6%), em 118 amostras de fran-
gos cozinhados. PIVNICK, em amostras de frango assado, mantidas

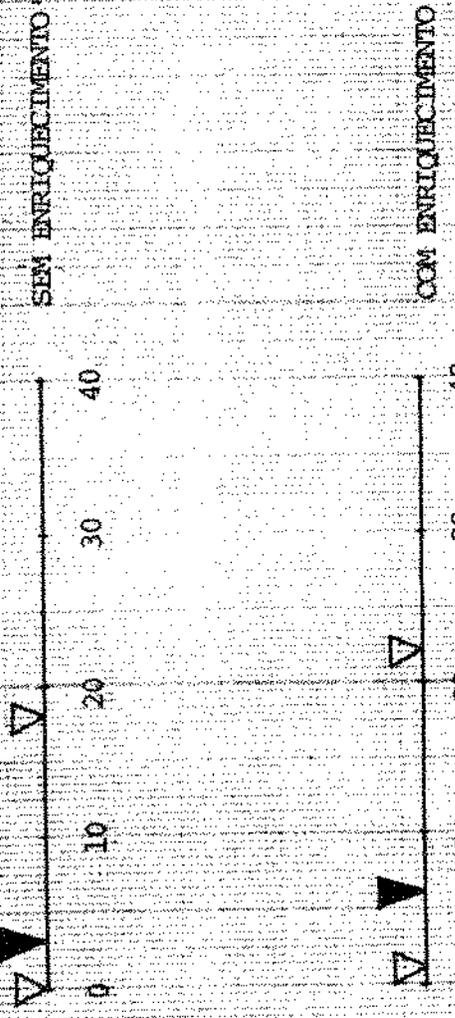


FIGURA 8

Percentagem de amostras de coxinhas de galinha, positivas para Clostridium perfringens, sem tratamento térmico, com e sem enriquecimento.

posteriormente 8 horas à temperatura de 37°C, encontrou 4% de amostras positivas, sem usar técnica de enriquecimento, e nós encontramos 4%, números idênticos.

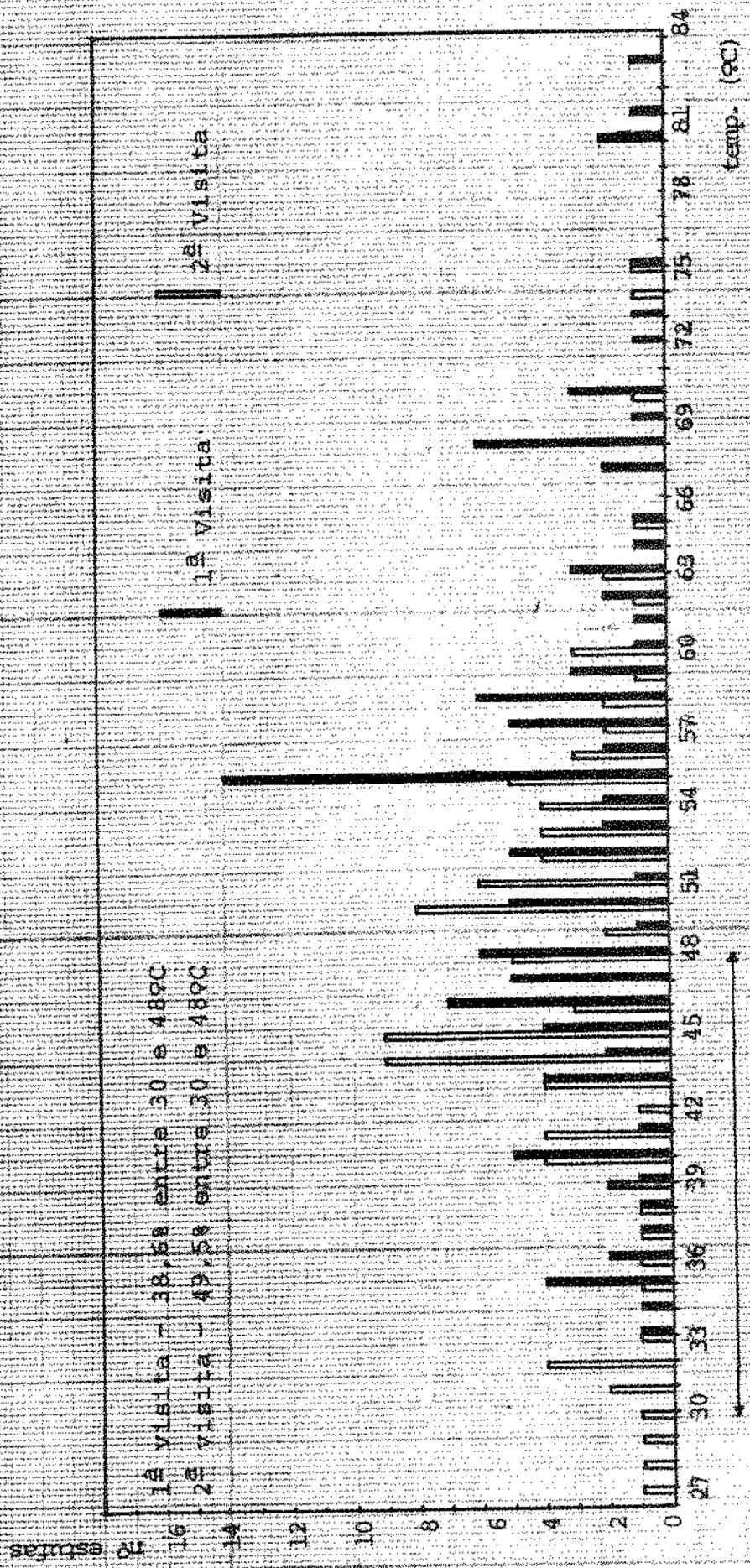
O fato de a coxinha de galinha conter uma população microbiana ($2,4 \times 10^4$) maior do que a da salsicha ($1,9 \times 10^2$) é provavelmente um reflexo das condições de comercialização das coxinhas de galinha, sempre mantidas em estufas, que conservam os produtos quentes até a hora da venda.

Para se avaliarem suas condições de funcionamento, foram realizadas inspeções em 120 estufas e repetidas, posteriormente, em 118. Destas, 3 funcionavam a banho-maria, 2 com lâmpadas, 3 com lâmpadas e resistência e 112 com resistência elétrica.

As temperaturas variavam muito, em consequência de manterem ou não a porta aberta; ou, se fechada, da frequência com que a abrem; de desligarem temporariamente o aquecimento; e, mesmo, até da localização do produto, no interior da estufa.

Na primeira visita que efetuamos, só uma estava fria, desligada e sem produtos, o que representava a percentagem de 0,8%; 4,2% continham produtos comestíveis (coxinhas, lingüiças, croquetes e quibes), situados no centro do aparelho, com temperaturas internas acima de 74°C; e 38,6%, com temperaturas entre 30 e 48°C (figura 9, p.101), faixa mais importante, do ponto de vista de multiplicação dos microrganismos. Na segunda visita, havia 9,4% de estufas desligadas e frias; só 1,7% com temperaturas iguais ou superiores a 74°C; e 49,5% tinham temperaturas entre 30 a 48°C, no centro geométrico dos produtos mantidos no meio do aparelho.

Na Inglaterra (86), uma lei, que entrou em vigor em 1 de Março de 1971, estabelece no nº 27 - 2 e 3 que, "se o alimento (car



FAIXA DE BOM CRESCIMENTO DO C. PERFRINGENS

FIGURA 9

Distribuição da frequência das temperaturas das estuárias de alimentos.

ne, peixe, molho de carne, imitação de carne, preparações destes ou contendo estas substâncias, ovos ou leite) não está acima de + 62,7°C ou abaixo de + 10°C, deve ser levado para fora dessas faixas-limite de temperaturas sem demora". No Brasil, todavia, a lei é omissa a este respeito.

Dos dados coletados em carne bovina, suína, frango, salsicha e lingüiça, procuramos inferir se havia alguma relação entre a freqüência de amostras positivas e o tipo de inspeção sanitária efetuada na indústria, considerando-se que há no Brasil três tipos: o primeiro, reconhecidamente mais exigente em normas técnicas e higiênicas, que designamos por inspeção tipo A; o segundo, menos exigente, que designamos por B1; e um terceiro, cujas exigências dependem dos locais onde atuam, — B2. Foram coletadas 105 amostras de carne suína, bovina, lingüiça e salsicha, sujeitas a inspeção tipo A (quadro VIII, p. 103 e figura 10, p. 104), as quais apresentaram 20,9% de amostras positivas em 105 examinadas. O intervalo de confiança para esta percentagem varia entre 14 e 31%.

Os mesmos produtos, sujeitos a inspeção tipo B1, apresentaram a média de 30,4% em 46 amostras, o que dá um intervalo de confiança entre 18 e 48% (quadro IX, p. 105 e figura 10, p. 104); e 10 produtos, sujeitos a inspeção B2 (quadro X, p. 106 e figura 10, p. 104), apresentaram a média de 30%, o que dá um intervalo de confiança entre 7 e 65%.

Não obstante a percentagem média encontrada no tipo A ficar dentro do intervalo de confiança do tipo B1 e B2, (fig. 10, p. 104), as médias destes dois últimos tipos de inspeção caem no limite superior do intervalo de confiança do tipo A, já que estes dois tipos não apresentam realmente diferenças significativas.

QUADRO VIII

QUADRO DE CARNE BOVINA, SUÍNA, LINGÜIÇA E SALSICHA, POSITIVAS E NEGATIVAS PARA CLOSTRIDIUM PERFRINGENS, SUJEITAS A INSPEÇÃO TIPO A.

FIRMA E INSPEÇÃO	PRODUTOS								CONJUNTO DE PRODUTOS		
	c.vaca		c.porco		Lingüiça		Salsicha		Positivo	Negativo	Total
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg			
1A							0	1	0	1	1
2A							1	5	1	5	6
3A	1	1	1	1			0	1	2	3	5
4A					1	3	0	1	1	4	5
5A					0	1			0	1	1
6A							1	1	1	1	2
7A					8	0	0	1	8	1	9
8A					0	1			0	1	1
9A					1	0			1	0	1
10A							0	2	0	2	2
11A							0	2	0	2	2
12A	0	1							0	1	1
13A			3	16					3	16	19
14A	0	20							0	20	20
15A	0	2	1	1					1	3	4
16A	2	7	0	7	1	0			3	14	17
17A	0	3	1	2					1	5	6
18A	0	1							0	1	1
19A							0	1	0	1	1
20A	0	1							0	1	1
TOTAL									22	83	105

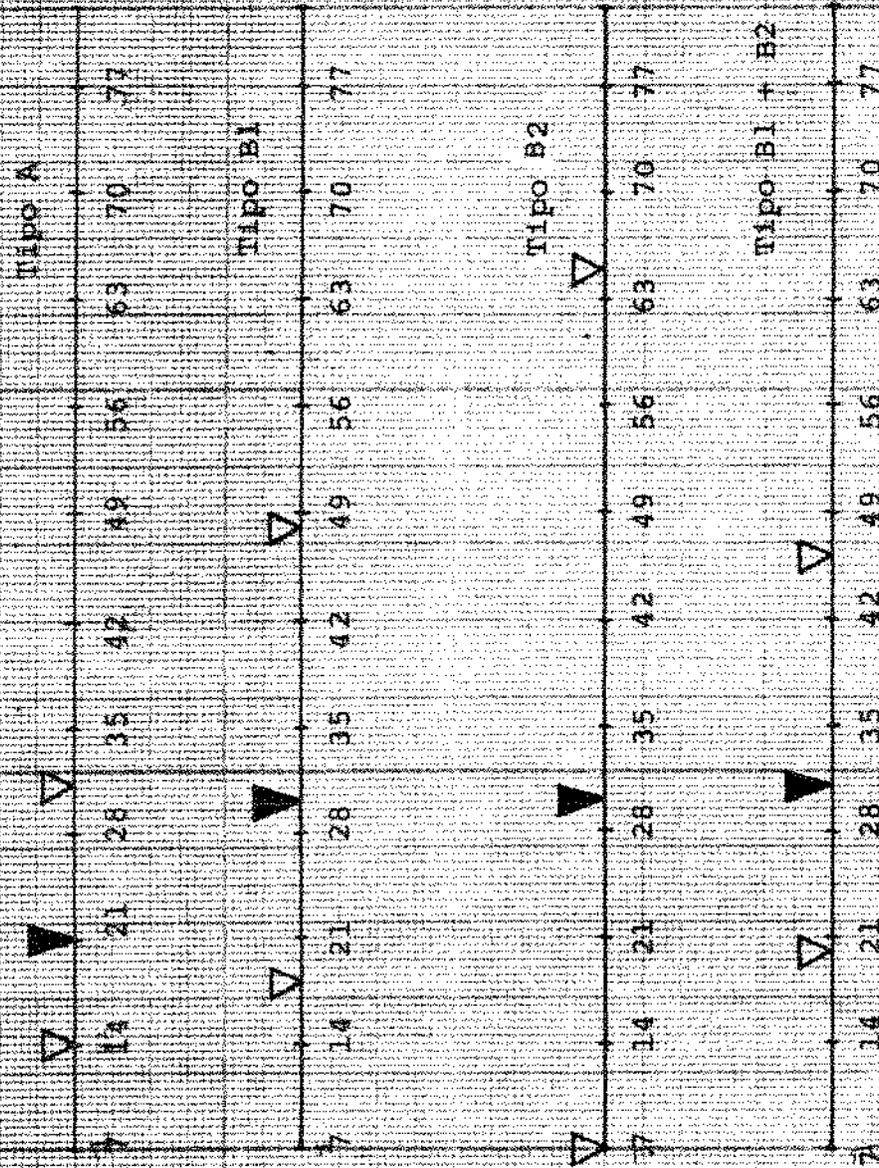


FIGURA 10

Percentagem média e limites de confiança das amostras positivas de carne bovina, carne suína, linguiça e salisicha, submetidas a inspeção tipo A, B1 e B2.

QUADRO IX

AMOSTRAS DE CARNE BOVINA, CARNE SUÍNA, LINGÜIÇA E SALSICHA, POSITIVAS E NEGATIVAS PARA CLOSTRIDIUM PERFRINGENS, SUJEITAS A INSPEÇÃO TIPO B1.

FIRMA E INSPEÇÃO	PRODUTOS								CONJUNTO DE PRODUTOS		
	C. Bovina		C. Suína		Lingüiça		Salsicha		Positivo	Negativo	Total
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg			
21 B1			1	2	0	1			1	3	4
22 B1	4	4	3	7	4	2	0	6	11	19	30
23 B1							0	1	0	1	1
24 B1					1	0			1	5	6
25 B1			0	1					0	1	1
26 B1					1	1			1	1	2
27 B1							0	1	0	1	1
28 B1					0	1			0	1	1
TOTAL	4	4	4	10	6	5	0	8	14	32	46

QUADRO X

AMOSTRAS DE CARNE BOVINA, CARNE SUÍNA, LINGÜIÇA E SALSICHA, POSITIVAS E NEGATIVAS PARA CLOSTRIDIUM PERFRINGENS, SUJEITAS A INSPEÇÃO B2, SEM INSPEÇÃO E DESCONHECIDA.

FIRMA E INSPEÇÃO	PRODUTOS								CONJUNTO DE PRODUTOS		
	C. Bovina		C. Suína		Lingüiça		Salsicha		Positivo	Negativo	Total
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg			
29 B2					0	1			0	1	1
30 B2					0	1			0	1	1
31 B2	0	1	0	2					0	3	3
32 B2					1	0			1	0	1
33 B2					1	0			1	0	1
34 B2	0	1							0	1	1
35 B2			0	1					0	1	1
36 B2			1	0					1	0	1
37 C					1	0			1	0	1
38 C					1	0			1	0	1
39 C					0	1			0	1	1
40 D					0	1			0	1	1
41 D							0	1	0	1	1
TOTAL	0	2	1	3	4	4	0	1	5	10	15

C - Clandestina

D - Procedência desconhecida

B2- Inspeção tipo B2

O número de amostras do tipo B1 e B2 é bem menor que as do tipo A e os seus intervalos de confiança são muito amplos, por isso não se justifica uma comparação isolada quer do tipo B1 com o A, quer do B2 com o A.

Visto que os resultados do tipo B1 são praticamente iguais aos do tipo B2, é mais razoável comparar o conjunto B1 e B2 com os dados do tipo A. A média deste cai justamente no limite inferior do conjunto B1 e B2 (figura 10, p. 104), pelo que, sendo o tipo B1 e B2 iguais, o tipo A é diferente. É, portanto, o tipo A menos contaminado.

Quanto a frangos sujeitos ao tipo A de inspeção (quadro XI, p. 108), entre 36 amostras encontramos 11,1% positivas, o que dá um intervalo de confiança de 4 a 28%. Para o tipo B1 de inspeção, em 16 amostras, apareceu a média de 25%, o que dá um intervalo de confiança entre 8 e 52% (quadro XII, p. 108).

Estes dados são insuficientes para, com segurança, se inferir, somente deles, se a inspeção A, também para frangos, se manifesta melhor que a B1. É crível que o tipo A seja melhor, porque há um perceptível deslocamento, para a direita, nos valores deste tipo e esse tipo de inspeção é melhor para carne bovina, suína, salichas e lingüiças.

Estes percentuais atrás enunciados, referentes aos tipos de inspeção, fazem ressaltar, sem dúvida, a importância da eficácia da inspeção sanitária na fonte de produção e processamento, não obstante o grande valor que também deve representar o controle sanitário no varejo, sabido que o estado higiênico dos produtos aí expostos resulta de um somatório de condições, que vão desde as ligadas à produção, processamento e transporte até às dos estabelecimentos varejistas.

QUADRO XI

AMOSTRAS DE FRANGO E CORVINA POSITIVAS E NEGATIVAS PARA CLOSTRIDIUM PERFRINGENS, SUJEITAS A INSPEÇÃO TIPO A.

FIRMA E INSPEÇÃO	PRODUTOS			
	Frango		Corvina	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
42 A	1	11		
43 A	0	6		
44 A	2	14		
45 A	1	1		
51 A			2	48
TOTAL	4	32	2	48

QUADRO XII

AMOSTRAS DE FRANGO POSITIVAS E NEGATIVAS PARA CLOSTRIDIUM PERFRINGENS, SUJEITAS A INSPEÇÃO TIPO B1

FIRMA E INSPEÇÃO	PRODUTO	
	Frango	
	Positivo	Negativo
46 B1	1	1
47 B1	2	2
48 B1	1	1
49 B1	0	6
50 B1	0	2
TOTAL	4	12

Da análise particular das firmas, onde foram coletadas as amostras, ocorre uma situação digna de nota. O estabelecimento 7A (quadro VIII, p.103), reconhecidamente de bom padrão higiênico e sanitário, apresentou todas as amostras de lingüiça positivas para C. perfringens. Esse estabelecimento deve ter, provavelmente, qualquer problema nessa seção que precisaria ser sanado. Deve-se ressaltar, a propósito, que este dado comprova, por um lado, a necessidade das indústrias terem um laboratório atuante, inclusive para surpreender eventuais falhas na higienização do equipamento, por vezes de difícil constatação à inspeção visual, mas que podem resultar na contaminação do produto, com conseqüências desagradáveis e, mesmo, imprevisíveis. Por outro lado, mostra também a necessidade dos laboratórios oficiais de controle passarem a efetuar, em caráter sistemático e obrigatório, a pesquisa do C. perfringens, a exemplo do que sucede com os coliformes, Staphylococcus e Salmonella.

A firma 22 B1 (quadro IX, p.105), uma indústria considerada de baixo padrão higiênico, já antes dos exames agora relatados, a despeito de ser talvez a maior fornecedora da cidade, denotou uma alta contaminação dos seus produtos, confirmando-se o juízo que se fazia.

Ainda, no quadro X (p. 106), se pode observar que, de três amostras de lingüiça, oriundas de três fabricantes clandestinos, duas revelaram-se positivas para C. perfringens.

3.2. DO ESTUDO DO SURTO DE INTOXICAÇÃO ALIMENTAR

Durante a realização deste trabalho, tomamos conhecimento de que algumas pessoas ficaram doentes em consequência de um almoço num restaurante, servido no dia 18/9/74. Suspeitando tratar-se de uma toxi-infecção de nosso interesse, distribuimos um primeiro questionário a 23 pessoas envolvidas, através do qual passamos a saber que, dentre elas, tinham ficado doentes 19. Por um segundo questionário, que se distribuiu depois no restaurante, verificamos que mais 74 pessoas adoeceram entre as 93 inquiridas.

Soubemos, posteriormente, que o restaurante implicado serviu mais de 2.000 refeições no citado dia e calculamos que mais de 500 pessoas ficaram doentes.

A relação dos sintomas dos doentes e sua percentagem figuram no quadro XIII (p. 111), pelo qual se verificava que a diarréia e dores abdominais foram os mais comuns (88,2% e 74,2%, respectivamente); o vômito apareceu em 8,6% das pessoas; e a febre, em apenas 6,5%. Esta percentagem pode ainda ser menor, de fato, pois não houve distinção entre febre documentada e subjetiva. É possível também ter havido resposta incorreta, por falta de instrução do inquirido. É interessante notar que, no primeiro questionário, distribuído a pessoas cultas, nenhuma mencionou a febre e o vômito.

O exame do quadro XIV (p. 112) e figura 11 (p. 114) denota que foi somente ao fim de duas horas que as primeiras pessoas começaram a se sentir doentes (duas pessoas) e que o mais longo período de incubação foi de 35 horas (uma pessoa). A mediana do tempo de incubação foi de 13 horas.

QUADRO XIII

DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS SINTOMAS EM 93 PESSOAS
INQUIRIDAS, NO SURTO DE INTOXICAÇÃO ALIMENTAR

Sintomas	nº de casos	percentagem
Diarréia	82	88,2
Dores abdominais	69	74,2
Tonturas	15	16,1
Prostração	13	14,0
Náusea	9	9,7
Vômito	8	8,6
Febre	6	6,5
Suores frios	1	1,1
Dores de cabeça	1	1,1

QUADRO XIV

DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS PERÍODOS DE
INCUBAÇÃO, NO SURTO DE INTOXICAÇÃO ALIMENTAR

Período de Incubação (h)	Número de casos (Frequência)	Frequência Acumulada
2	2	2
3	1	3
4	4	7
5	6	13
6	7	20
7	4	24
9	4	28
10	2	30
11	1	31
12	6	37
13.....	11.....	48 (38-48)
14	10	58
15	9	67
16	4	71
17	8	79
18	4	83
19	2	85
20	1	86
21	1	87
23	1	88
32	1	89
35	1	90
TOTAL	90	

Obs: 3 doentes não responderam a este quesito.

A análise da figura 11 (p. 114) mostra duas populações com modas às 6 e 13 horas. Procurando relacionar essas duas populações com os dados obtidos nos inquéritos, pôde-se verificar que também houve duas populações que afluíram ao restaurante em tempos diferentes: uma maior, com moda às 11 h e 15 minutos, e outra população menor, com moda às 12 h e 7 minutos (figura 12, p. 115 e quadro XV, p. 116), portanto com intervalo de cerca de 1 hora. Deve-se inferir que a população maior da figura 12 (p. 115), cuja moda foi às 11 horas e 15 minutos, ingeriu os alimentos com menor número de microrganismos e teve um período de incubação mais longo (2ª população, a maior da figura 11, p. 114, com moda às 13 horas) que a população que comeu mais tarde. Esta, que comeu mais tarde, menor (2ª população da figura 12, p. 115, cuja moda é de 12 horas e 7 minutos), ingeriu os alimentos com maior número de microrganismos e teve incubação de menos tempo (1ª população da figura 11, p. 114, cuja moda foi de 6 horas).

Da análise da figura 13 (p. 117), depreende-se que a duração dos sintomas foi, em regra, menor que 24 horas (1 dia); e que, além deste tempo, só houve 7 casos, ou seja, 8,3% (quadro XVI, p. 118). O pico existente nas 24 horas desta figura deve ser interpretado como resposta não correta das pessoas que se recuperaram antes das 24 horas.

Interpretando todos os dados, pode-se afirmar que a diarreia extremamente comum, as dores abdominais também comuns, a febre e os vômitos raros, a mediana do tempo de incubação de 13 horas, os tempos de incubação a partir de 2 horas, a pequena duração dos sintomas e a recuperação de quase todos os doentes em 24 horas (uma pessoa ficou doente 8 dias, com complicações intestinais, e teve

NO DE BARRAS

PRIMEIROS 10 DIAS

OUTROS 71 DIAS

PERÍODOS DE INCUBAÇÃO (A)

0 5 10 15 20 25 30 35 40

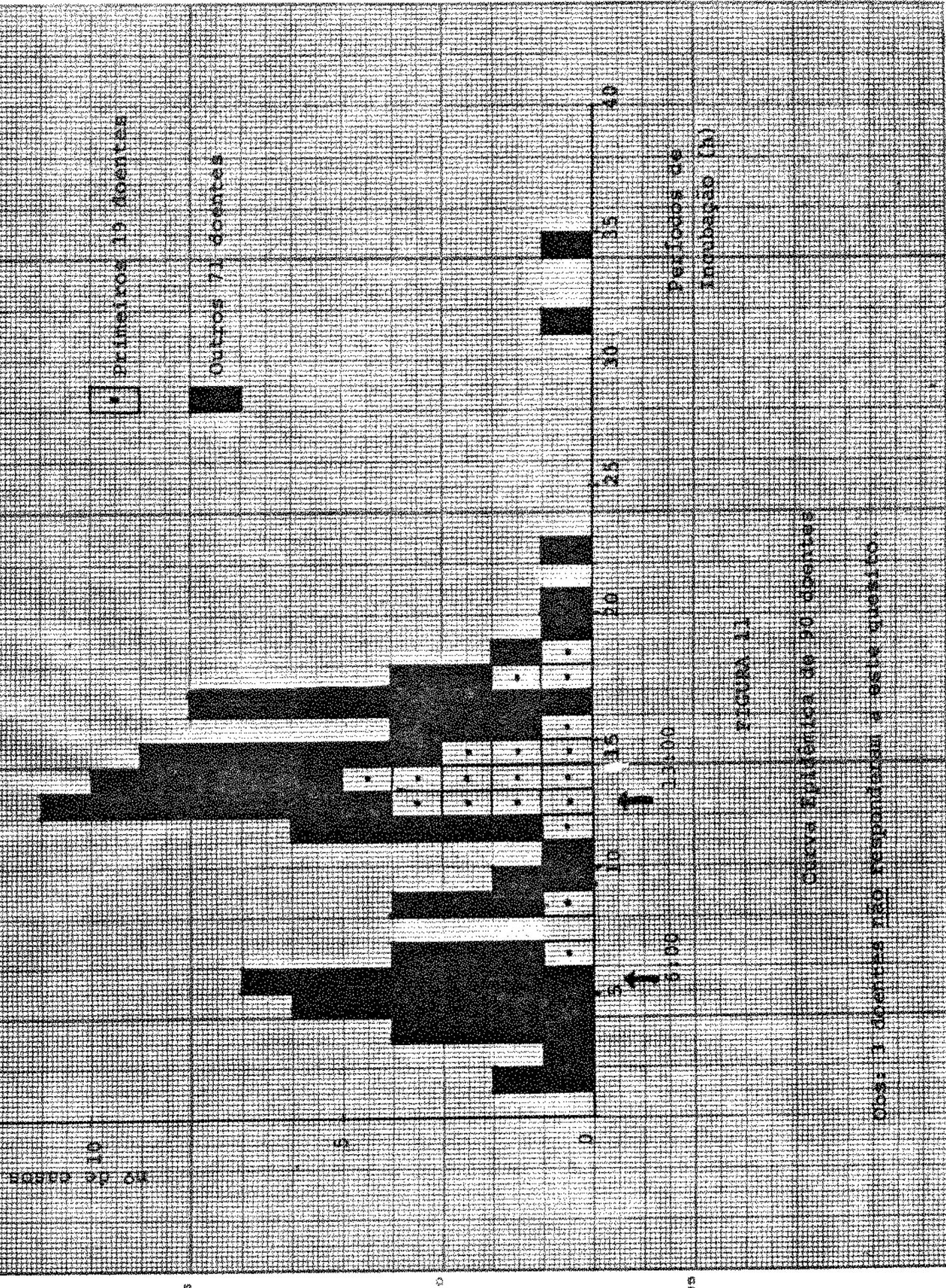
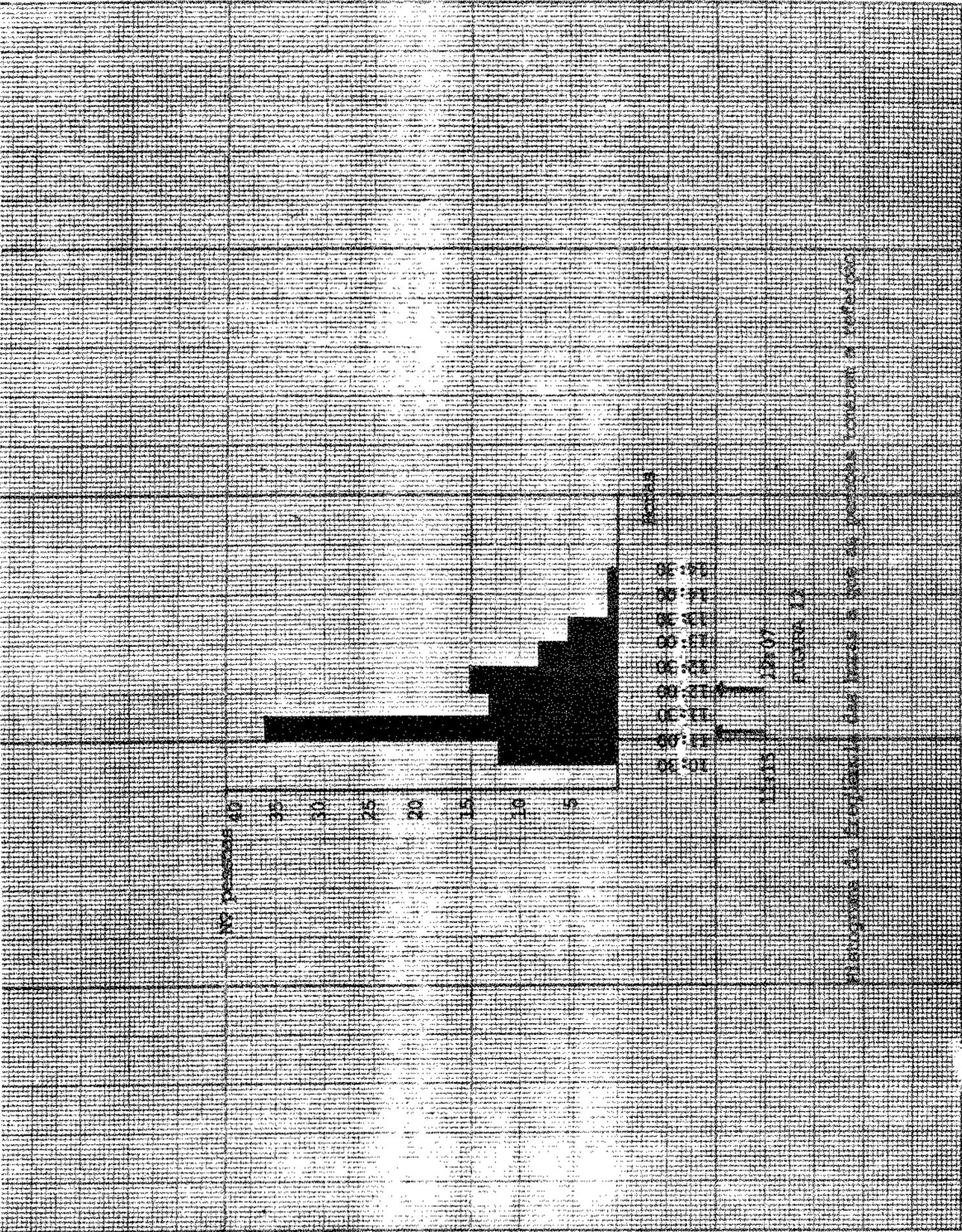


FIGURA 11

GRUPO EXPERIMENTAL 30-90 DIAS

005: 10 DIAS 120 PERÍODOS DE INCUBAÇÃO E 006: 71 DIAS



20

18

10

8

QUADRO XV

SURTO DE INTOXICAÇÃO ALIMENTAR

DISTRIBUIÇÃO DAS HORAS DE INÍCIO DAS REFEIÇÕES DOS DOENTES

Horas		Número de pessoas*
10:30	- 10:59	12
11:00	- 11:29	36
11:30	- 11:59	13
12:00	- 12:29	15
12:30	- 12:59	8
13:00	- 13:29	5
13:30	- 13:59	1
14:00	- 14:29	1
Total		91

obs: 2 doentes não responderam a este quesito

nº de casos

10

5

0

Primeiros 19 dentes

Outros dentes

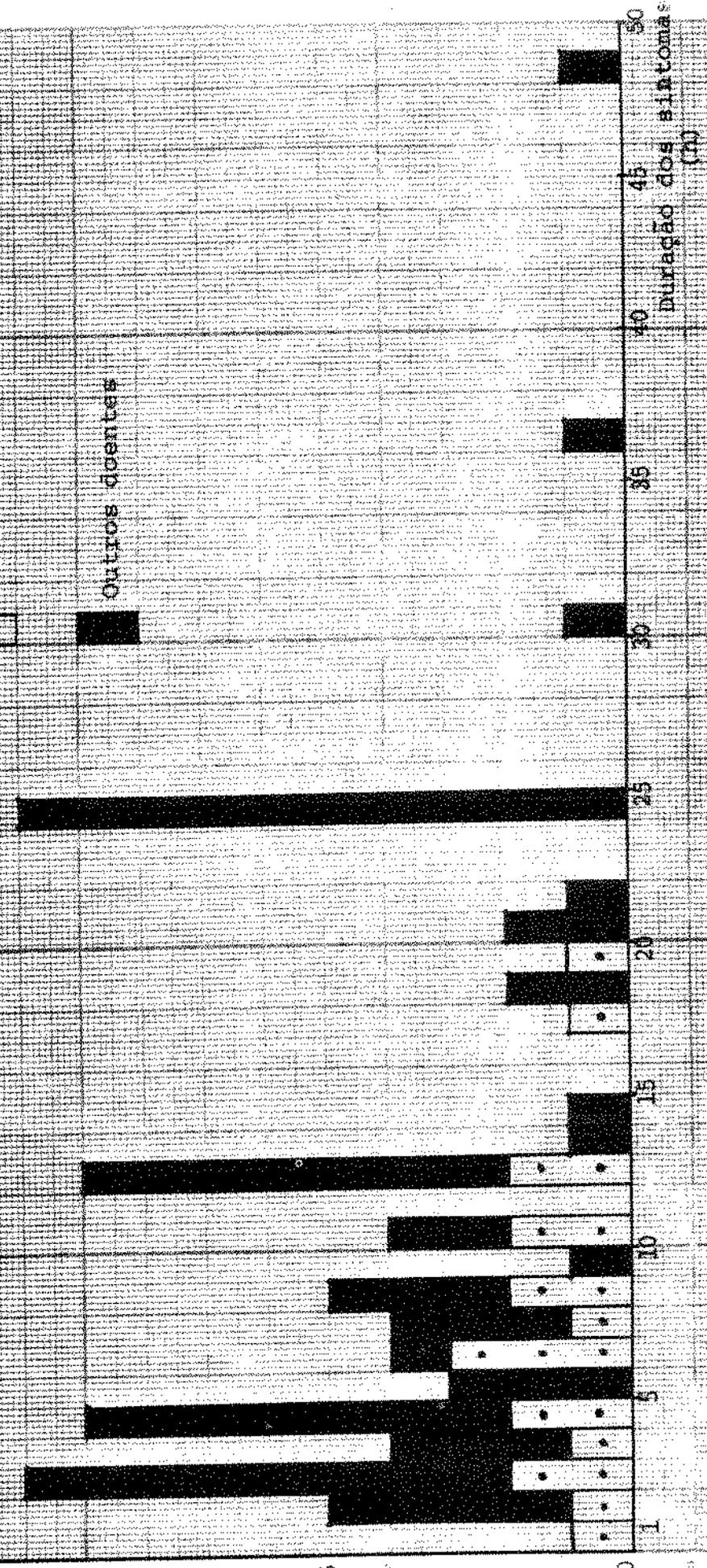


FIGURA 13

HISTOGRAMA DA FREQUÊNCIA DA DURAÇÃO DOS SINTOMAS

QUADRO XVI

SURTO DE INTOXICAÇÃO ALIMENTAR
DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DA DURAÇÃO DOS SINTOMAS

Duração (h)			Número de pessoas
0	-	0:59	1
1	-	1:59	5
2	-	2:59	10
3	-	3:59	4
4	-	4:59	9
5	-	5:59	3
6	-	6:59	4
7	-	7:59	4
8	-	8:59	5
9	-	9:59	1
10	-	10:59	4
12	-	12:59	9
13	-	13:59	1
14	-	14:59	1
17	-	17:59	1
18	-	18:59	2
19	-	19:59	1
20	-	20:59	2
21	-	21:59	1
24	-	24:59	10
30	-	30:59	1
36	-	36:59	1
48	-	48:59	1
72	-	72:59	1
96	-	96:59	1
120	-	120:59	1
192	-	192:59	1
TOTAL			85

Obs: Oito pessoas não responderam a este quesito.

que ser internada em hospital) são evidências que levam a pensar que a doença poderia ter sido causada por C. perfringens, Bacillus cereus ou Streptococcus faecalis. A ocorrência das percentagens de vômitos e febre por nós verificadas tampouco exclui a possibilidade de tratar-se destas doenças. O "Guia para Investigações de Surto de Toxi-Infecções Alimentares do Centro para Controle de Doenças", em Atlanta (179), apresenta, como exemplo destas doenças, um surto com 91% de diarréias, 72% de dores abdominais, 9,7% de vômitos, 7,1% de febre subjetiva e 1,8% de febre documentada. Há, como se vê, uma nítida coincidência entre os sintomas por nós observados e os que foram apontados como exemplo no guia.

A fim de esclarecer a real causa do surto, coletamos ainda 11 amostras de fezes de pessoas doentes. Essas amostras foram obtidas 2 a 3 dias depois da ingestão da já mencionada refeição e as contagens de C. perfringens por grama de fezes foram as seguintes:

a - 6,0 10	g - 4,2 x 10 ⁵
b - 6,6 x 10 ⁴	h - 1,0 x 10 ⁶
c - 1,2 x 10 ⁵	i - 2,6 x 10 ⁶
d - 1,4 x 10 ⁵	j - 5,6 x 10 ⁶
e - 1,5 x 10 ⁵	l - 1,9 x 10 ⁷
f - 3,0 x 10 ⁵	

A contagem de 6,6 x 10⁴ foi obtida sobre alíquota menor que as outras, prevendo-se que teria alcançado cifra bem mais elevada. É de ressaltar-se, também, que a comparação dos resultados dos exames de fezes do surto em estudo com os resultados de pessoas normais em Belo Horizonte (quadro XVII, p. 120) ou de pessoas normais

QUADRO XVII

DISTRIBUIÇÃO DA CONTAGEM DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS POR GRAMA DE FEZES, NO SURTO EM ESTUDO E NA POPULAÇÃO NORMAL DE BELO HORIZONTE.

	Surto em estudo		População Normal*
	nº	%	de Belo Horizonte %
< 10 ⁴	-	-	29
10 ⁴ - 10 ⁵	2	18,2	25
10 ⁵ - 10 ⁶	5	45,5	31
> 10 ⁶	4	36,3	15

* Comunicação pessoal de H. Riemann.

QUADRO XVIII

DISTRIBUIÇÃO DA CONTAGEM DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS POR GRAMA DE FEZES, NA POPULAÇÃO NORMAL E NA DE OUTRO SURTO.

	Surto em Estudo %	Pessoas Normais*	Pessoas com toxi-infecção*
		%	%
< 10 ³	-	40	9,9
10 ³ - 10 ⁵	18,2	52	15,1
> 10 ⁵	81,8	8	75,0

* Segundo Sutton et al., 1971.

e com intoxicação por C. perfringens, em outro país (quadro XVIII, p. 120), revela que há maior número de microrganismos nas fezes do surto ocorrido em Campinas, em potências maiores que 10^5 , que nas normais mencionadas nos dois quadros. Também é maior a contagem no surto em estudo que no do estrangeiro.

Do conjunto dos dados referentes às contagens em fezes e dos dados sintomatológicos colhidos dos doentes, pudemos inferir tratar-se de uma toxi-infecção provocada por C. perfringens.

Quanto ao alimento mais incriminado, o quadro XIX (p. 122) indica que a maionese foi o alimento que mostrou a mais alta taxa de ataque para as pessoas que "comeram" alimentos específicos; e a que mostrou a mais baixa taxa de ataque na coluna das pessoas que "não comeram". A diferença destas duas taxas foi de + 83,7%.

Não se pode inculpar a salsicha, embora tenha sido o alimento que teve maior percentagem de doentes na coluna referente "às pessoas que comeram", porque só uma pessoa a comeu e porque tem uma taxa alta de ataque na coluna das "pessoas que não comeram".

A maionese, o alimento mais suspeito de ter causado a intoxicação, foi preparado com batata cozida, filé de corvina congelada, gema de ovo batida com óleo, "Ketchup", sal, pimenta, cebolinha, mostarda e limão.

A batata foi cozida de véspera, descascada e depois posta no frigorífico, segundo uma versão; ou deixada, com a corvina, à temperatura ambiente, durante a noite, segundo outra versão.

A corvina foi comprada em filés congelados e estes, depois de descongelados, foram recortados para aproveitamento das porções que melhor se prestam para fritar. O que sobrou foi novamente guardado e, de um conjunto de sobras de alguns dias, fez-se a maionese.

QUADRO XIX

TAXAS DE ATAQUE CAUSADAS PELOS ALIMENTOS

Alimentos servidos	Pessoas que COMERAM um alimento específico			Pessoas que NÃO COMERAM um alimento específico			DIFERENÇA
	doente	não doente	Taxa de ataque total	doente	não doente	Taxa de ataque total	
Arroz	85	12	87,6%	8	1	88,9%	-1,3
Feijão	83	12	87,4%	10	1	90,9%	-3,5
Maionese	92	5	94,8%	1	8	11,1%	+83,7
Carne de porco	82	12	87,0%	11	1	91,6%	-4,6
Farofa	27	7	79,4%	66	6	91,7%	-12,3
Suco de laranja	31	7	81,6%	62	6	91,2%	-9,6
Abacaxi	9	1	90,0%	84	12	87,5%	+2,5
Salsicha	1	0	100%	92	13	87,6%	+12,4

Durante os dias em que se esperou que se atingisse uma quantidade suficiente de retalhos do peixe, o frigorífico foi esvaziado para limpeza e algumas vezes o peixe ficou à temperatura ambiente, por tempo indeterminado. O descongelamento para a confecção da maionese, informaram ter sido feito "numa câmara de verdura, de um dia para o outro".

Os fatos apontados levam-nos a admitir que a corvina, quando foi usada para se fazer a maionese, estava muito contaminada. Convém mesmo lembrar que não haverá semelhança com a contaminação da corvina obtida para os exames a que procedemos e que sintetizamos no quadro VII, p. 89. Para mais, a corvina do surto agora relatado é em filés, que pressupõem muito manuseio e contaminação na indústria.

No dia de se preparar a maionese (uma informação é de que foi na véspera; outra, que foi feita às 6 horas e trinta minutos da manhã do dia da ingestão), a corvina foi aferventada por somente 15 minutos e juntada aos restantes ingredientes. Se a maionese ficou à temperatura ambiente, desde a véspera, esteve sujeita, na cozinha, a temperaturas mais elevadas que 16,6°C, pois foi esta a mínima exterior, na grama, registrada nessa noite, próximo do local. Depois teria continuado sujeita às temperaturas do dia 18. Se a maionese tiver sido preparada só às 6,30 horas do dia 18, ela ficou, também, em temperaturas adequadas para crescimento do C. perfringens, na cozinha, pois, externamente e próximo, às 7 horas, a temperatura era de 19,2°C e, às 14 hs, já era de 32,1°C.

3.3. DA AVALIAÇÃO DA NOVA MODIFICAÇÃO DO MEIO DE WILLIS & HOBBS

Entre as muitas dificuldades que encontramos na execução do nosso trabalho, que, sem dúvida, concorreram para retardá-lo em muito, uma prendeu-se à pouca eficácia do meio de WILLIS & HOBBS (W.H.), para a evidenciação da reação da lecitinase. Com efeito, tivemos que desistir várias vezes do prosseguimento das experiências, após o habitual período de incubação anaeróbia de 24 h, por que o meio em referência não ensejava suficiente crescimento das culturas e muito menos evidenciava halo de lecitinase.

Assim, o mais comum, e isso já verificávamos desde 1973 (fig. 32, p.135), era a inibição da estria, na metade que continha a anti-toxina, havendo, algumas vezes, até completa inibição da estria de semeadura dos dois lados ou formação de colônias esparsas e não de um aglomerado contínuo (fig. 27, 28, 30, 31, 33 e 34), como sempre sucedia no meio por nós modificado ou no de WILLIS & HOBBS modificado por HALL (W.H.H.). Todavia três das experiências conduzidas no meio de WILLIS & HOBBS, em tempos diferentes, tiveram bom êxito, mas nem sempre de forma constante. Os gráficos que se apresentam são a média desses resultados (figuras 14 a 25).

Os dados referentes à largura do halo são apresentados nos gráficos em uma expressão matemática que é uma média de observações variáveis, segundo determinadas circunstâncias. Por exemplo, a espessura do meio é um fator muito importante na extensão do halo: quanto mais fino o meio, mais se expande a reação de lecitinase. Verificamos que 3 mm de espessura é uma boa medida, mas isso não se consegue em toda a placa, visto o fundo não ser plano. Um tempo de incubação pequeno pode produzir uma reação de lecitinase

evidente num meio fino e não a dar num meio espesso.

Porém, se observa que as placas, com o meio fino, evidenciam menos a viragem de cor do vermelho neutro.

Há que considerar que o tamanho do halo é medido em milímetros e os seus limites não são nítidos, mas são uma transição ténue e de difícil percepção. A dificuldade de percepção aumenta, se o halo, em vez de intenso ou médio, é ténue. Deve-se ainda considerar que a reação varia, segundo a quantidade de inóculo transportado na alça, a qual nem sempre é constante em todas as placas.

Por outro lado, os limites das percepções de coloração dos halos da placa — ténue, médio e intenso — admitem variações subjetivas.

Mas, de um modo geral, as formas com que se expressaram, nos gráficos anexos, o tamanho e cor das reações, dão uma idéia prática das situações encontradas.

A cultura C, na nova modificação (N) por nós ora apresentada, sempre mostrou nítido halo de lecitinase, em qualquer das incubações (fig. 14 e 15 — símbolos 1, a — p. 126).

O meio de WILLIS & HOBBS (W.H.) não mostrou reação de lecitinase para esta cultura e o meio de WILLIS & HOBBS, modificado por HALL (W.H.H.), sempre se mostrou negativo, nos primeiros dias, tendo, na minoria dos casos, apresentado uma ténue e estreita reação, de visualização muito difícil, depois de alguns dias de incubação em anaerobiose, seguida de colocação em meio ambiente; ou apresentado um contorno da estria mais nítido, que deixa dúvida se não se trata de uma película semelhante a madrepêrola, consequência da reação de lipase (fig. 14 e 15 — símbolos 2, b e 3, c — p. 126).

Nas placas colocadas na geladeira, a reação só é visível no meio N (fig. 16 — 1, a). Parece que as temperaturas baixas fazem estacionar a produção de lecitinase ou, dependendo do meio, impedem mesmo essa reação.

A cultura III mostra uma boa reação de lecitinase no meio N (fig. 17, 18 e 19 — 1, a — p.130) e no meio W.H.H. (fig. 17, 18 e 19 — 2, b — p.130), quer em incubação anaeróbia, quer em anaeróbia seguida de exposição no meio ambiente, quer em anaeróbia seguida de geladeira.

No meio W.H., a reação também é visível em qualquer das duas primeiras incubações, mas é pior em percepção e aparece mais tardiamente, ao fim de mais tempo de incubação (fig. 17 e 18 — 3, c — p. 130). Este meio, quando vai para a geladeira, torna quase imperceptível a reação (fig. 19 — 3, c — p.130).

A cultura 64 é a única das quatro que apresenta reação evidente em qualquer dos três meios e tipos de incubação. Porém, o meio N e W.H.H. superam o de W.H., na extensão da reação e intensidade da coloração (fig. 20, 21, 22, p.131).

A cultura 246 só apresenta reação de lecitinase no meio N (fig. 23, 24 e 25 — 1, a — p. 132). Pode, neste meio, ao fim de 24 h de incubação, ser tênue e difícil de se precisarem os limites, mas no segundo dia já tem, pelo menos, uma intensidade média e é bem visível. No meio W.H. e W.H.H., a reação é negativa (fig. 23, 24 e 25 — 2, b, 3, c — p. 132).

De uma análise do valor das três diferentes incubações, comparando as figuras 14 com 15, 17 com 18, 20 com 21 e 23 com 24, pode-se concluir ser indiferente para a obtenção da reação de lecitinase, manter as placas em aerobiose ou passá-las para o meio ambien

te, depois de um dia de incubação anaeróbia: cresce a extensão do halo opalescente e, se a estirpe for das que apresentam a reação tardia, isso virá a acontecer em qualquer das duas incubações.

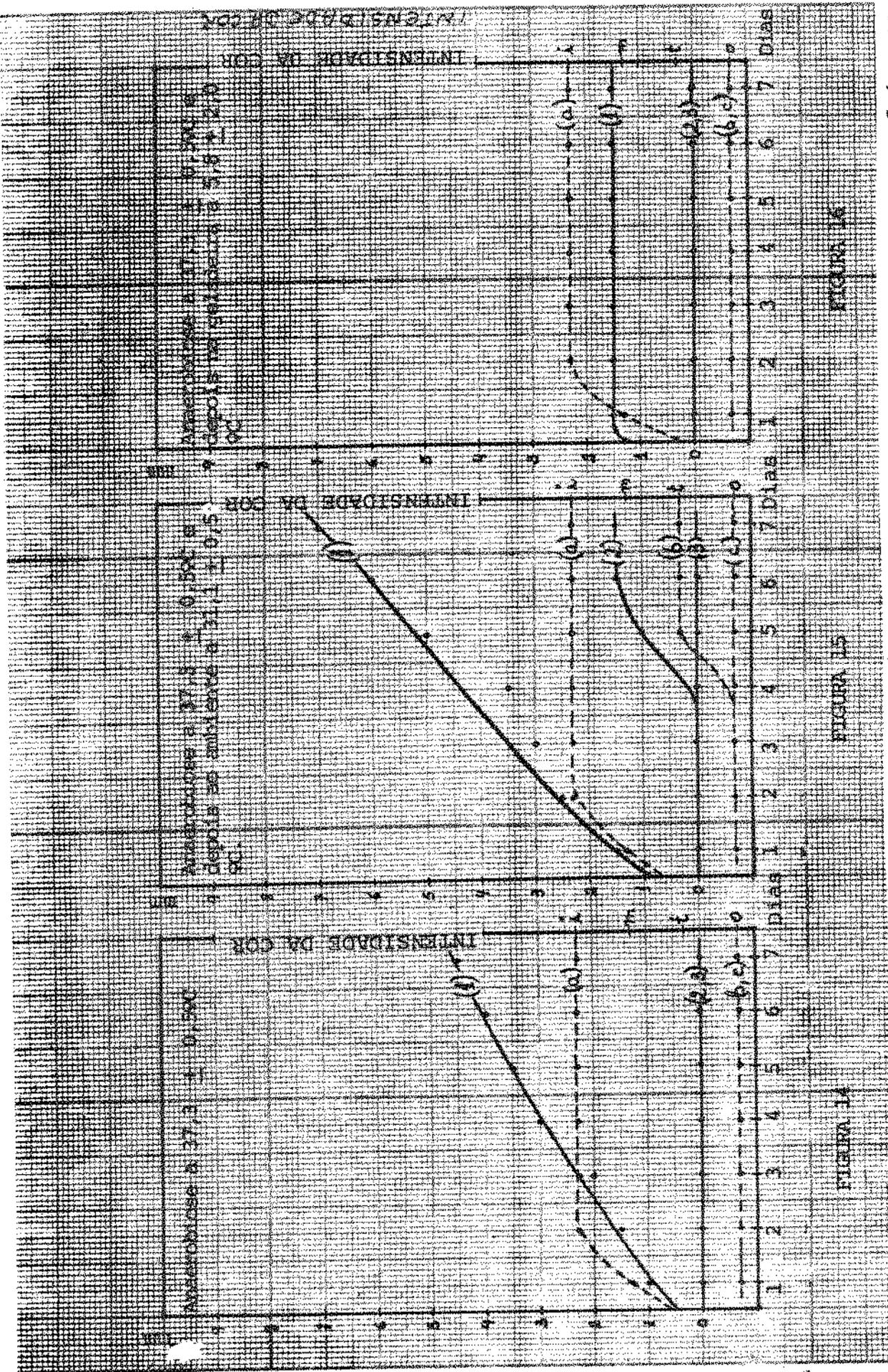
Assim, depois da incubação anaeróbia de 24 horas, se não con vier manter as placas neste tipo de incubação, poder-se-ão colo car à temperatura ambiente, para observação posterior. Mas, no ca so de não aparecerem logo as reações da lecitinase, as placas que contiverem microrganismos suspeitos de serem C. perfringens devem manter-se, por mais tempo do que o citado pelos autores (vide p. 59), em qualquer das duas incubações apontadas. Em nossa experiência, a incubação no ambiente sô mostra o inconveniente de poder contaminar-se a placa, o que nós evitávamos parcialmente, colocan do-as entre algodão esterilizado.

Quanto à incubação anaeróbia de 24 horas, seguida de manutenção das placas em refrigerador, os gráficos revelam uma paralisa ção da reação de lecitinase, depois da saída da anaerobiose (fig. 16, p.129; 19, p.130; 22, p.131; 25, p.132). A prática demonstra ainda que no frio se torna mais nítida a reação opalescente já existente antes da entrada nessa temperatura, não porque esta reação aumente, mas porque os limites se tornam bem mais nítidos, for mando-se um contorno externo no halo, que o separa nitidamente do meio. A maior nitidez desses limites não é obtida por formação de zonas extras para fora do halo pre-existente, como é citado na literatura, mas à custa da superfície do halo já existente.

Os limites obtidos no frio vêm-se mais acentuadamente no meio N e no meio W.H.H., onde as imagens, já antes das placas irem para a geladeira, são melhores que no meio de W.H. (fig. 32, 33 e 34, p.135).

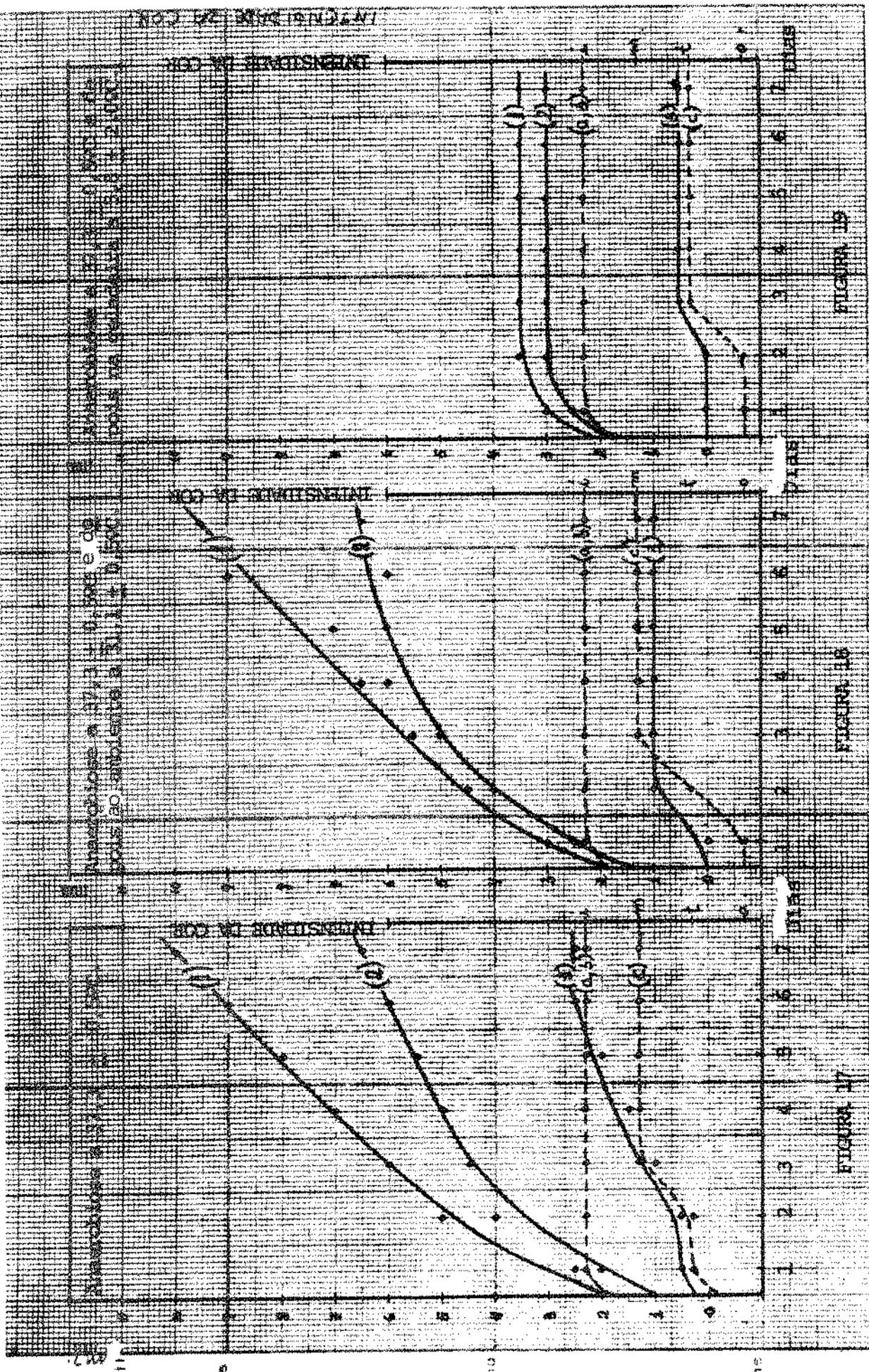
No primeiro meio, no meio N, as colônias ou as estrias são amarelo-róseas no princípio e vão-se tornando vermelhas com o tempo (fig.31, p. 134 e 34, p.135); o meio, de vermelho, logo no primeiro dia, se se tratar de estria de C. perfringens, passa a cor mais clara, um róseo claro, com o tempo, como já foi observado por vários autores.

Em resumo: ao fim de um dia de incubação anaeróbia, só no meio por nós modificado é que se evidenciam nítidas reações de lecitinase nas quatro culturas estudadas (comparem-se as figuras 26, 27 e 28, p. 133); prolongando a incubação por seis dias, observou-se expansão dos halos da reação de lecitinase, mas ainda assim só no meio por nós modificado se apresentaram positivas as quatro culturas (comparem-se as figuras 29, 30 e 31, p.134); ao fim de um dia de incubação anaeróbia, seguida de seis dias de permanência em geladeira, também só o meio novo apresentou as quatro culturas com reação positiva (comparem-se as figuras 32, 33 e 34, p.135), mas sem a expansão do halo de lecitinase, que se observa quando há uma incubação de mais de um dia fora da geladeira (comparem-se as figuras 29, 30 e 31, p.134, com as figuras 32, 33 e 34, p.135).



Medidas dos halos da reação de lecitinase e percepção das cores da CULTURA C de C. perfringens

- SÍMBOLOS: - algarismos e linhas contínuas - mm do halo de lecitinase (1, no meio novo; 2, no meio WHH; 3, no meio WH);
- letra e linhas tracejadas - intensidade da cor (a, no meio novo; b, no meio WHH; c, no meio WH); i, percepção intensa; m, percepção média; t, percepção tênue.

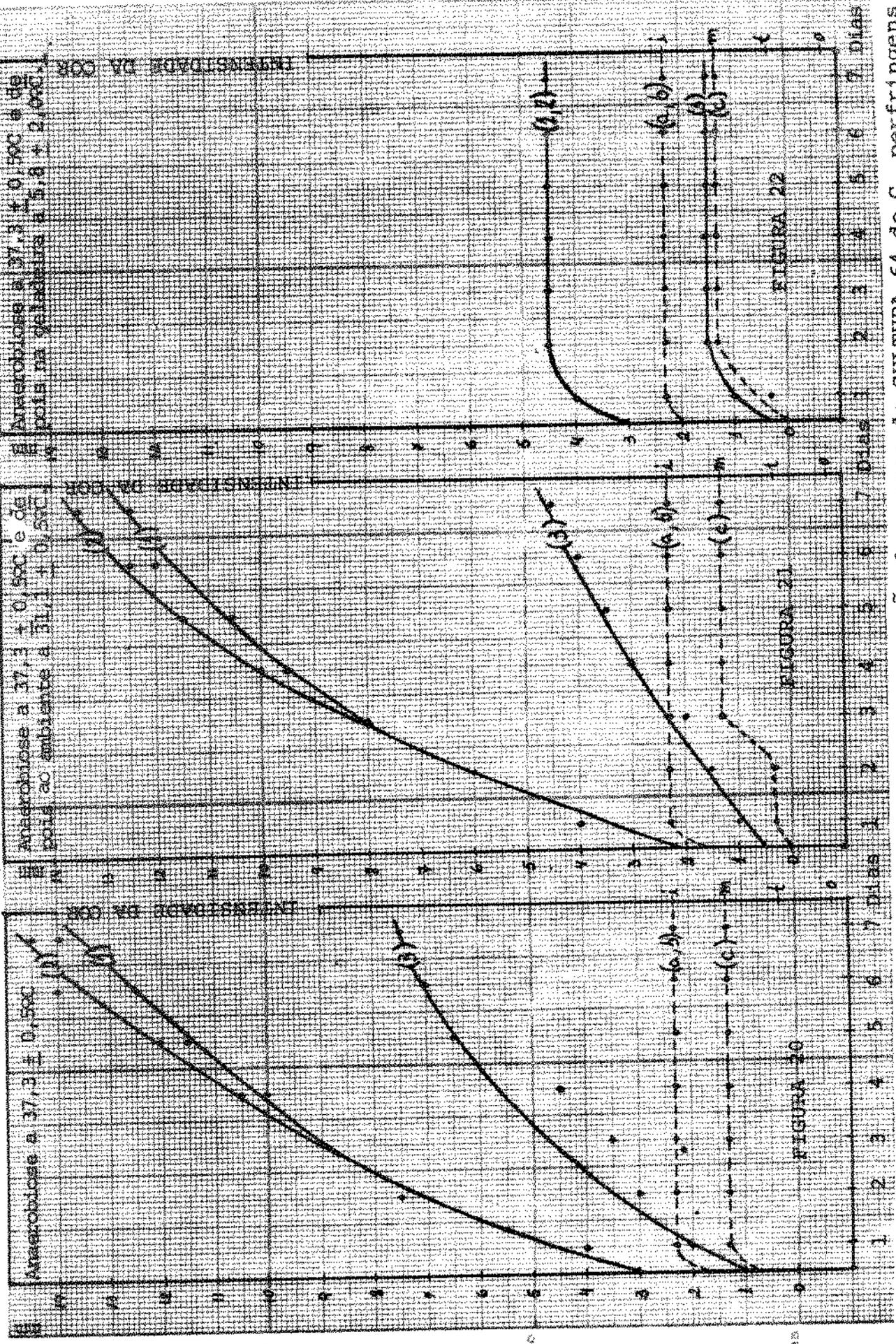


Medidas dos halos da reação de lecitinase e percepção das cores da CULTURA III de *C. perfringens*.

SÍMBOLOS: - algarismos e linhas contínuas - mm do halo de lecitinase (1, no meio novo; 2, no meio WHH; 3, no meio WH);

WHH; 3, no meio WH);

- letras e linhas tracejadas - intensidade da cor (a, no meio novo; b, no meio WHH; c, no meio WH); i, percepção intensa; m, percepção média; t, percepção tênue.



Medidas dos halos da reação de lecitinase e percepção das cores da CULTURA 64 de *C. perfringens*

SÍMBOLOS: - algarismos e linhas contínuas - mm do halo de lecitinase (1, no meio novo; 2, no meio WHH; 3, no meio WH);

- letras e linhas tracejadas - intensidade da cor (a, no meio novo; b, no meio WHH, c, no meio WH); i, percepção intensa; m, percepção média; t, percepção tênue.

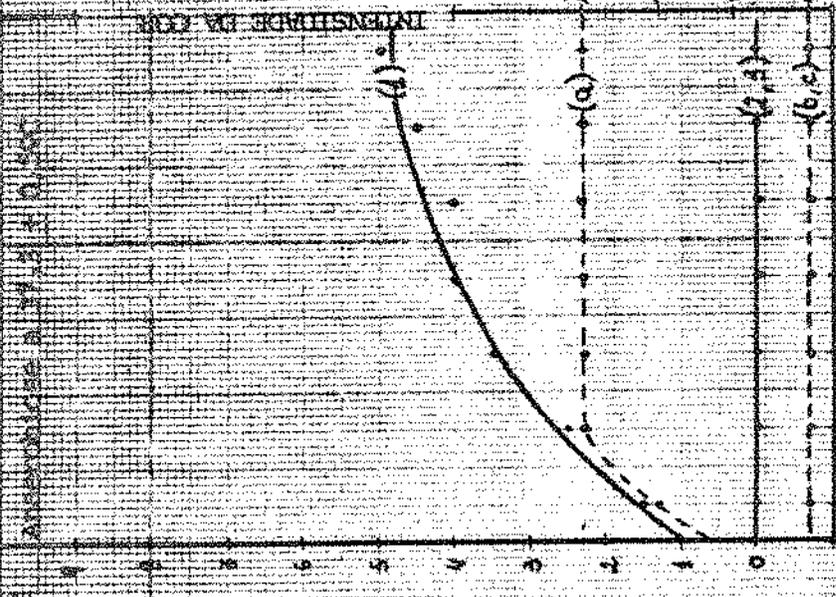


FIGURA 23

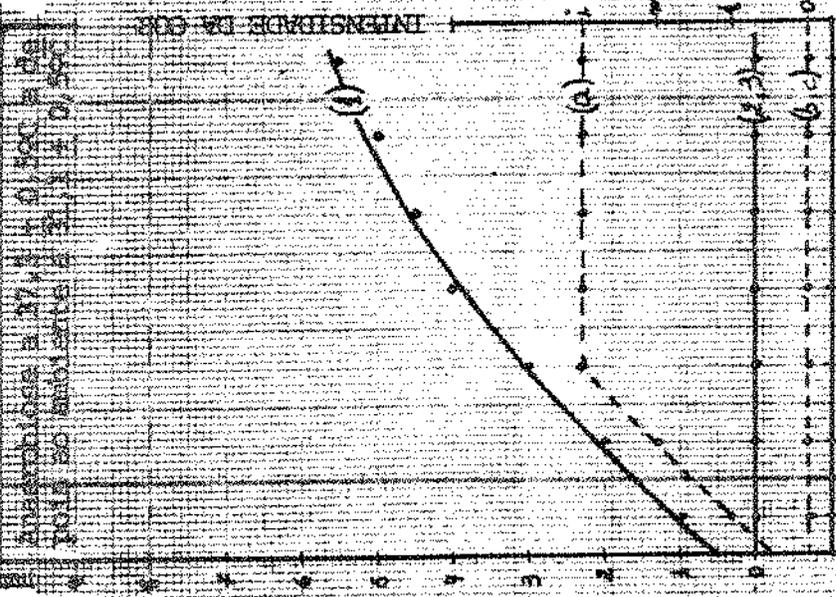


FIGURA 24

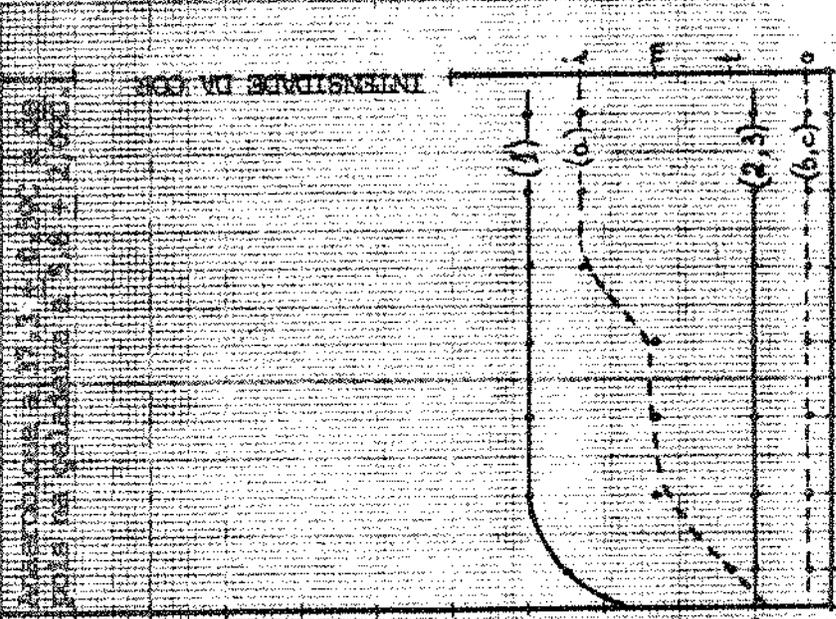


FIGURA 25

Medidas dos talos na reação de lecitinase e percepção das cores da CULTURA 246 de *C. perfringens*

SÍMBOLOS: — algarismos e linhas contínuas — mm do talo de lecitinase (1, no meio novo; 2, no meio velho);
 WHH; 3, no meio velho;
 — letras e linhas tracejadas — intensidade da cor (a, no meio novo; b, no meio velho; c, no meio WHH); 1, percepção intensa; m, percepção média; t, percepção tênue.

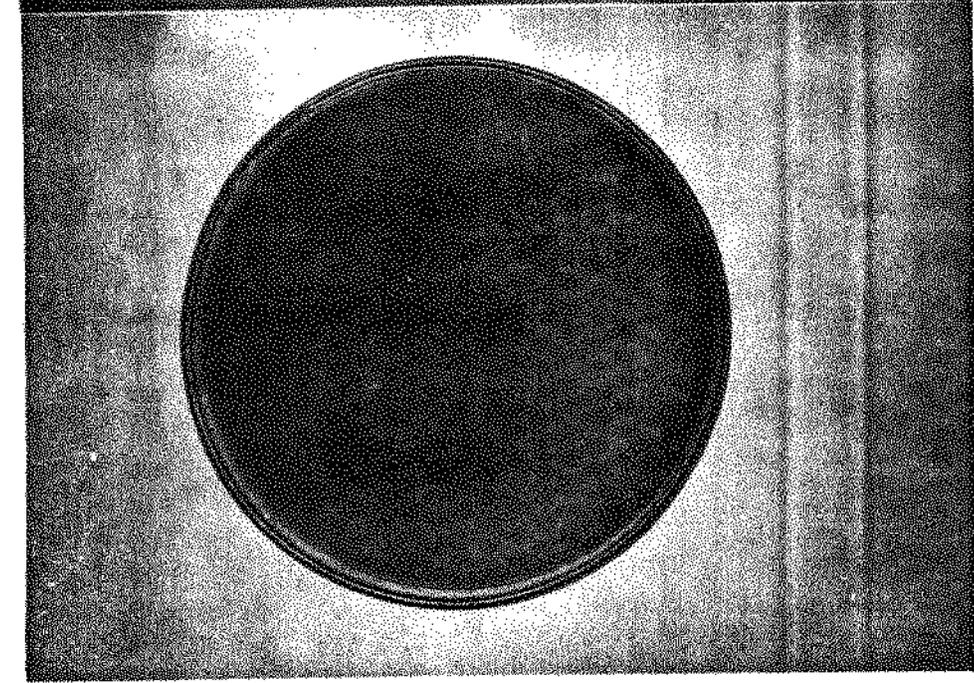


FIGURA 26

Meio de WILLIS & HOBBS

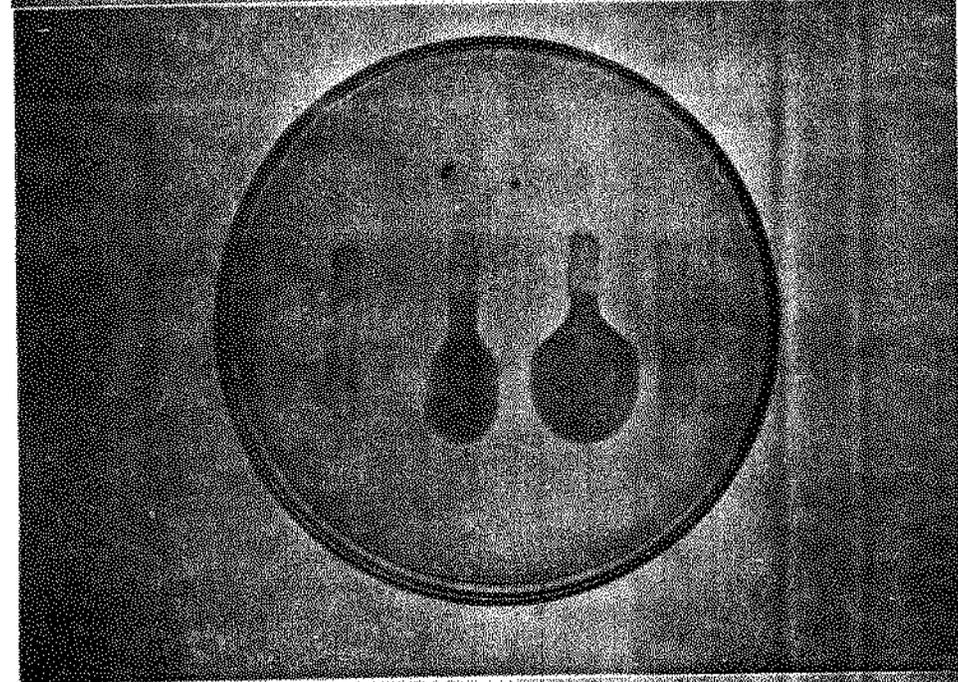


FIGURA 27

Meio de WILLIS & HOBBS,
modificado por HALL.

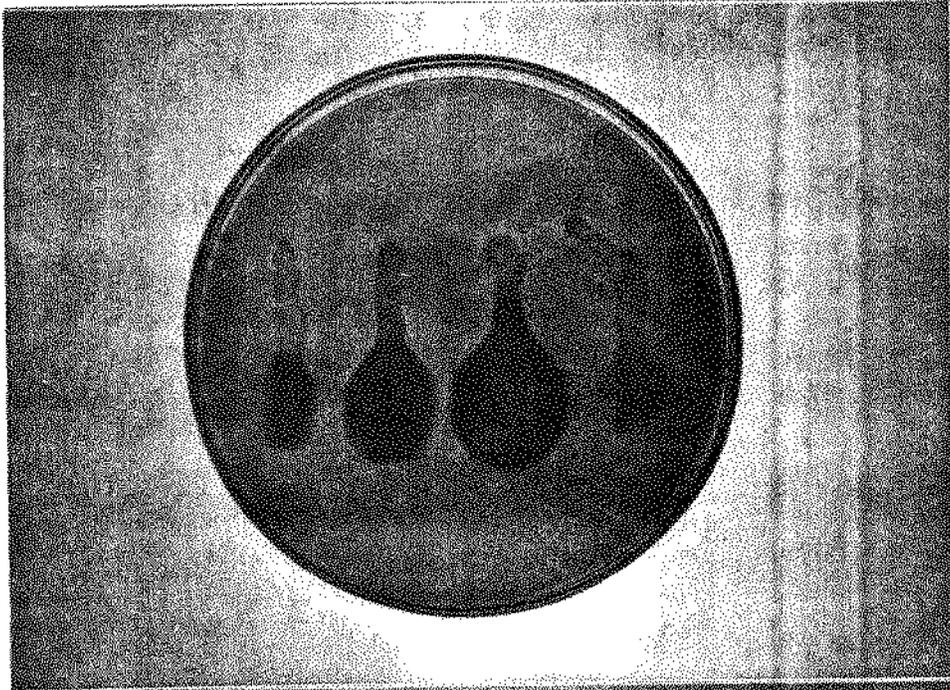


FIGURA 28

Meio de WILLIS & HOBBS,
por nós modificado.

Obs: 1 dia de incubação em anaerobiose de 4 culturas (de cima para baixo: cultura C, III, 64, 246).

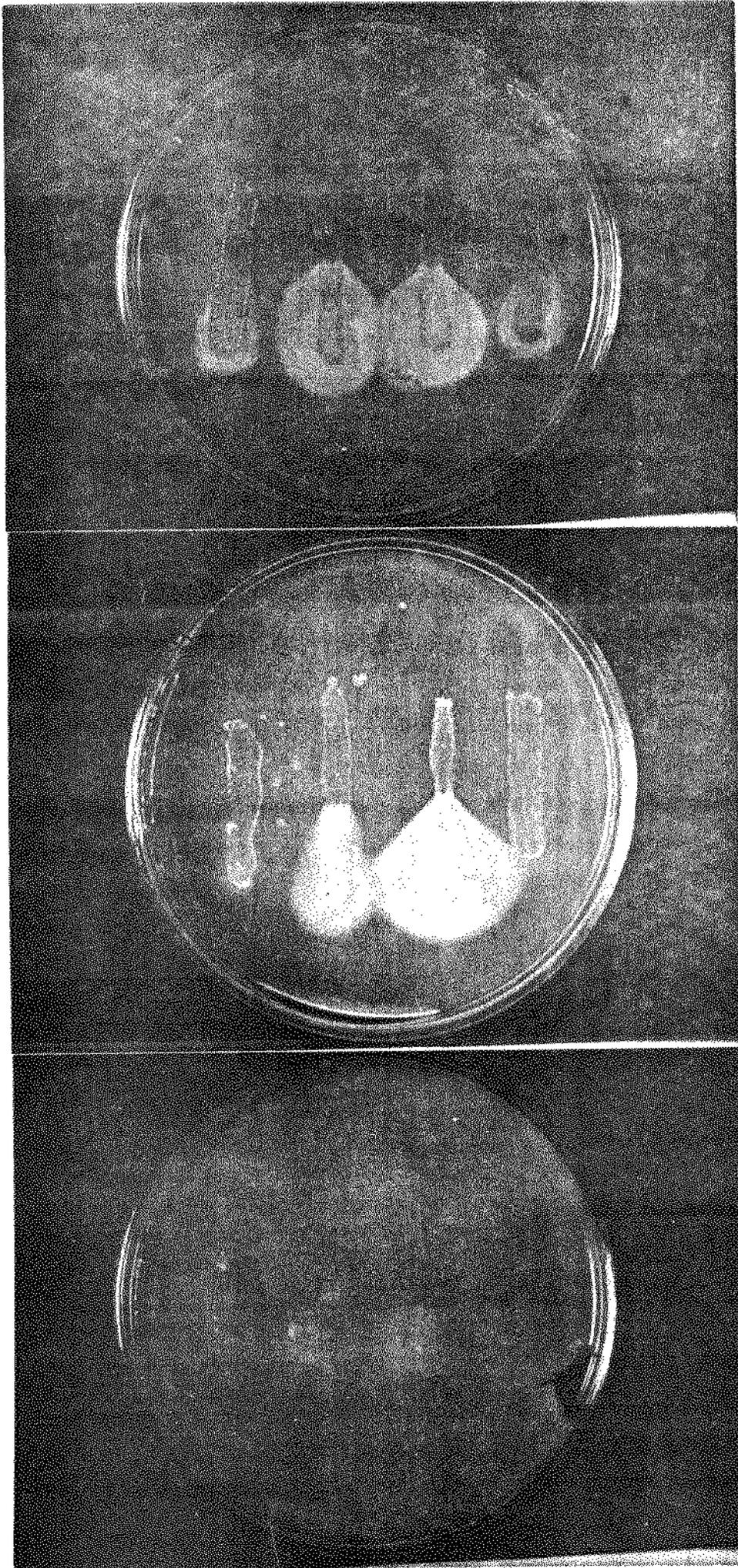


FIGURA 29

Meio de WILLIS & HOBBS

FIGURA 30

Meio de WILLIS & HOBBS,
modificado por HALL.

FIGURA 31

Meio de WILLIS & HOBBS,
por nós modificado.

Obs: 6 dias de incubação em anaerobiose em 4 culturas (de cima para baixo: cultura C, III, 64, 246).

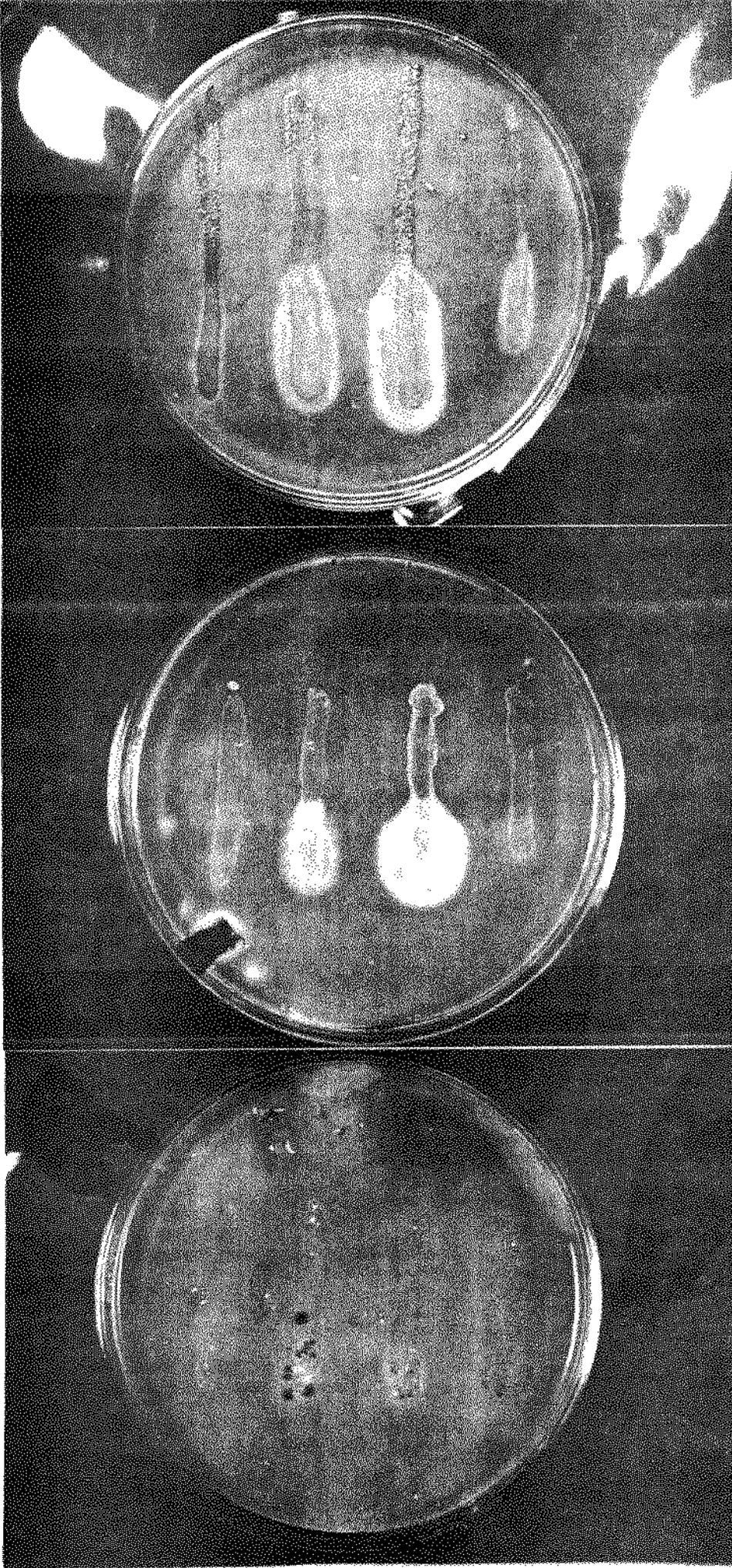


FIGURA 32
Meio de WILLIS & HOBBS

FIGURA 33
Meio de WILLIS & HOBBS,
modificado por HALL.

FIGURA 34
Meio de WILLIS & HOBBS,
por nós modificado.

Obs: 1 dia de incubação em anaerobiose, seguido de 6 dias em geladeira, de 4 culturas (de cima para baixo: cultura C, III, 64 e 246).

4. CONCLUSÕES

Nas nossas condições de trabalho, parece-nos lícito concluir o que se expõe abaixo.

4.1. Todas as variedades de alimentos que constituíram o material base de nossas experiências revelaram contaminação por C. perfringens, sendo variável a freqüência das amostras positivas. Tal evidência leva-nos a atribuir à insuficiência de investigação científica na matéria o fato de já não terem sido observadas no Brasil intoxicações alimentares no homem por C. perfringens, sabido que a presença deste germe em alimentos geralmente implica ocorrência dessa ordem. Evidencia-se a necessidade do controle e pesquisa sistemáticos do C. perfringens pelos serviços oficiais e empresas que manipulam alimentos, a fim de se evitarem surpresas, como aquela referente ao estabelecimento 7A (quadro VIII, p. 103).

4.2. Dentre os alimentos estudados, não se verificou diferença significativa na freqüência de amostras contaminadas no que respeita à carne suína, carne de ave, carne bovina e corvina, muito embora esta última apresentasse menor freqüência. Em alguns casos, essas freqüências são diferentes das assinaladas por autores estrangeiros, o que se deve, provavelmente, às diferentes condições de abate ou de pesca, transporte, manipulação e comercialização dos nossos produtos.

4.3. Nas carnes, ocorrem formas esporuladas e, entre estas, as resistentes à fervura de uma hora.

4.4. Há também contaminação por C. perfringens em alimentos processados, como salsichas, lingüiças frescas e coxinhas de galinha. As lingüiças frescas são os produtos que denotam maior frequência de amostras positivas, não obstante ser baixa a população de C. perfringens.

4.5. Os produtos sujeitos à inspeção sanitária do tipo A (a mais exigente do Brasil) revelaram menor frequência de amostras positivas para C. perfringens.

4.6. As estufas usadas nos bares para aquecimento de produtos comestíveis, já prontos para consumo, em duas visitas, foram encontradas, em percentagem elevada (38,6% e 49,5%), com temperaturas que favorecem a multiplicação do C. perfringens.

4.7. Quanto à metodologia utilizada, releva concluir:

4.7.1. a homogeneização dos alimentos, para exame bacteriológico, pode-se fazer em solução de Ringer a 1/5; diluições mais elevadas são mais facilmente pipetadas, mas, por outro lado, diminuem as possibilidades de detecção do C. perfringens;

4.7.2. as jarras e as estufas a vácuo usadas não permitem uma adequada anaerobiose, pelo que não se deve fazer uma só exaustão, mas quatro sucessivas, alternadas com inoculação de gases inertes;

4.7.3. sem o uso de um processo laboratorial de purificação, visando a eliminação do oxigênio, não se deve usar o nitrogênio, vulgarmente encontrado no mercado sob o nome de "nitrogênio comercial" ou "nitrogênio industrial", por impuro.

4.8. Quanto à prova de lecitinase, importa observar:

4.8.1. ocorrem falsas reações negativas de lecitinase no meio de S.F.P., no meio de WILLIS & HOBBS e na modificação deste, feita por HALL et al., sendo que quatro culturas, semeadas nestes dois últimos meios, nem sempre deram reações positivas, o que invariavelmente ocorreu no meio por nós apresentado;

4.8.2. quando as culturas evidenciam halo de lecitinase, a difusão desse halo cresce com o tempo, quer a incubação se mantenha sempre em anaerobiose, quer se mantenha um dia nesta e depois em aerobiose, a 31°C; salvo a possível contaminação, que é mais fácil quando as placas vão para aerobiose, não há diferença sensível entre os dois tipos de incubação referidos;

4.8.3. nestes dois tipos de incubação, pode a reação não ser evidente no primeiro dia, mas vir a apresentar-se em dias subsequentes;

4.8.4. a colocação de placas em geladeira, depois de sofrerem uma incubação de 24 h em anaerobiose, sob observação visual, parece paralisar a reação de lecitinase;

4.8.5. quanto mais fino é o meio distribuído nas placas, mais nítido se torna o halo de culturas que dão fraca reação de lecitina_{se} e mais se expande (uma espessura de 3 mm do meio é aconselhá_{vel}).

ABSTRACT

INCIDENCE OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS IN FOODS, AN OUTBREAK OF HUMAN FOOD INTOXICATION, AN IMPROVEMENT IN THE TEST FOR LECITHINASE.

1. In order to investigate the incidence of C. perfringens in food products sold in Campinas, São Paulo, the following samples were examined: 50 portions of ground beef (ground at the market), 50 samples of pork in small pieces, 50 samples of corvina (Micro-pogon spp.), 50 portions of chicken cut in small pieces, 35 pieces of fresh pork sausage, 31 pieces of frankfurter sausage, and 31 samples of coxinhas de galinha, all obtained from various retailers, except for the corvina which was obtained from a wholesaler.

After homogenization, the samples were plated on Petri dishes with blood agar and confirmation of the microorganism made in the medium of WILLIS and HOBBS (1958). In the search for C. perfringens in beef, pork, chicken, and corvina, three procedures were used. In the first, the blood agar was inoculated directly with the homogenized meat. In the second, the same inoculation was done after heating at 80°C for 10 minutes. In the third, the cooked meat medium was inoculated with the homogenizate, heated in a boiling water bath for 60 minutes, incubated, and plated on blood agar.

The average frequencies of positive samples in these media were, for beef, 10%, 2% and 4%; for pork 20%, 0% and 6%; 15%, 0% and 2% for chicken; 4%, 0% and 0% for corvina.

For the same tests made on frankfurter sausage, pork sausage, and coxinhas, only two procedures were used. In the first, identical, homogenized samples of frankfurter sausages were plated directly on blood agar. In the second, the homogenized samples were inoculated directly into cooked meat medium and then plated on

blood agar. The frequencies of positive samples were 3% and 6%, respectively. Similar procedures were used for fresh pork sausage and the results were 6% and 60%; for coxinhas de galinha, results were 3% and 6%.

Examining 120 warming ovens and then 118 more that had products ready to eat, the results were respectively 38.6% and 49.5%, with temperatures between 30°C and 48°C which is a favorable condition for the development of C. perfringens.

2. When food intoxication occurred at a cafeteria, a questionnaire was distributed to 2,016 persons who had had the meal. The inquiry revealed that 88.2% of the people had had diarrhea, 74.2% abdominal pain, 16.1% dizziness, 14% prostration, 9.7% nausea, 8.6% vomiting, 6.5% fever. The median incubation time was 13 hours. The duration of the symptoms was at least 24 hours in almost all the patients. More C. perfringens was found in the feces of patients than in those of normal persons. The food suspected of causing the intoxication was a mayonaisse made of corvina and potatoes.

3. In view of the difficulties of showing the presence of lecithinase, four cultures of C. perfringens were used to inoculate three different media: the medium of WILLIS & HOBBS (1958); the same medium modified by HALL et al. (1969); and the medium of WILLIS & HOBBS modified by us. Only in the last did the four cultures show a reaction of lecithinase in a clear and unequivocal way and within 24 hours.

ANEXO Nº 1

Ágar-Sangue (Fórmula de A.T. WILLIS, "Public Health Laboratory", Luton, Inglaterra)

1. Ágar Peptona

NaCl	2 g
Peptona	4 g
Água destilada	400 ml

Aquecer 20 min. e filtrar

pH - 7,6 a 7,4

Ágar	6,0 g
------	-------

Esterilizar por 15 min.

Distribuir em placas, na quantidade de 5 a 10 ml por placa.

2. Ágar-Sangue

Caldo nutriente	600 ml
-----------------	--------

pH - 7,6 a 7,4

Ágar	9,0 g
------	-------

Esterilizar

Esfriar a 50°C

Sangue	30 ml
--------	-------

Colocar 10 ml desse meio em cada placa, sobre o ágar peptona.

Uso: Espalhar sobre cada placa 0,006 ml de sulfato de neomicina a 1%.

ANEXO Nº 2

Meio de Caldo de Carne Cozida (Fórmula de "The Food Hygiene Laboratory", Colindale Avenue, London.)

Coração de boi sem gordura	1.000 g
Hidróxido de sódio N/20	1.000 ml

- 1 - Aquecer o hidróxido de sódio.
- 2 - Juntar a carne moída, misturar bem.
- 3 - Ferver em fogo lento, por 20 min., mexendo freqüentemente.
- 4 - pH - 7,5.
- 5 - Coar em gaze.
- 6 - Espremer.
- 7 - Espalhar sobre papel-filtro e secar.
- 8 - Colocar em tubo de vidro de rosca e adicionar caldo nutriente "Oxoid" nº 2 até 1 1/2 polegada.

ANEXO Nº 3

Meio de Gema de Ovo - Lactose (Fórmula de WILLIS & HOBBS - 1958)

1. Caldo nutriente	300 ml
Ágar	6,0 g
Lactose	3,0 g
Vermelho neutro (1%)	0,9 ml
pH - 7,6	

2. Autoclavar a 121°C, por 20 min.
3. Esfriar a 50 - 55°C.
4. Adicionar suspensão de gema de ovo:

1 gema de ovo	}	30 ml
20 ml de salina (0,9%)		
5. Distribuir em placas e secar.

QUESTIONÁRIO

Por favor, responda ao seguinte questionário e devolva-o.

IDADE.....ANOS

SEXO.....

1. Tomou refeição no dia 18/9/74, no..... SIM ()
NÃO ()

Se SIM, responda: a. A que horas tomou a refeição?.....horas

b. Que alimentos comeu?.....
.....
.....
.....

2. Ficou doente? SIM ()
NÃO ()

Se SIM, responda: a. A que horas e em que dia ficou doente?.....horas do dia.....

b. Que sintomas teve?

- Diarréia () - Vômito ()
- Dores abdominais () - Febre ()
- Prostração () - Tonturas ()
- Náusea () - Outros

c. Quantas horas duraram os sintomas?.....horas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, D.M. — Inactivation of Clostridium perfringens type A spores at ultrahigh temperatures. Appl. Microbiol. 26: 282-287, 1973.
2. AHMED, M. & WALKER, H.W. — Germination of spores of Clostridium perfringens. J. Milk Food Technol. 34: 378-384, 1971.
3. ALBERT BROWNE LTD, Leicester, England — Some interesting facts about the sterilization of surgical materials. (1963, 19 páginas).
4. ANDO, Y. — [Germination of spores of Clostridium spp. capable of causing food poisoning. VII. Ionic germination of spores of heat-resistant strains of Clostridium perfringens type A] (em japonês). Journal of the Food Hygienic Society of Japan 16: 25-29, 1975. Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol. 7, nº 9, 9c321, 1975).
5. ANDO, Y. — [Germination of spores of Clostridium species capable of causing food poisoning. V. Ionic germination of spores of some heat-sensitive strains of Cl. perfringens type A] (em japonês). Journal of the Food Hygienic Society of Japan 15: 373-376, 1974. Apud: Food Science and Technology abstracts (vol. 7, nº 8, 8c284, 1975).
6. ANDREWS, F.W. — On an outbreak of diarrhoea in the wards of St. Bartholomew's Hospital. Lancet i: 8-9, 1899.
7. ANGELOTTI, R; HALL, H.E.; FOTER, M.J. & LEWIS, K. H. — Quantitation of Clostridium perfringens in foods. Appl. microbiol. 10: 193-199, 1962.

8. BAIRD-PARKER, H.C. — Factors affecting the production of bacterial food poisoning toxins. J. Appl. Bact. 34: 181-197, 1971.

9. BARACH, J.; ADAMS, D.M. & SPECK, M.L. — Recovery of heated Clostridium perfringens type A spore on selective media. Appl. Microbiol. 28: 793-797, 1974.

10. BARNES, E.M.; DESPAUL, J.E. & IMGRAM, M. — The behaviour of a food poisoning strain of Clostridium welchii in beef. J. Appl. Bact. 26: 415-427, 1963.

11. BARTLETT, M.L.; WALKER, H.W. & ZIPRIN, R. — Use of dogs as an assay for Clostridium perfringens enterotoxin. Appl. Microbiol. 23: 196-197, 1972.

12. BEERENS, H.; FIEVEZ, L. & ROMOND, C. — Clostridium counting commencing with food products with low atmospheric oxygen-characterization of Clostridium perfringens. Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol. 6, n° 6, 6S785, 1974).

13. BERG, R.W. & SANDINE, W.E. — Activation of bacterial spores. A review. J. Milk Food Technol. 33: 435-441, 1970.

14. BERRY JR, M.R. & DICKERSON JR, R.W. — Apparatus for maintaining holding temperature while serving cafeteria rounds beef. Journal of Food Science 40: 1095-1098, 1975.

15. BOURLAND, C. T.; HEIDELBAUGH, N.D.; HUBER, C.S.; KISER, P.R. & ROWLEY, D.B. — Hazard analysis of Clostridium perfringens in the skylab food system. Milk Food Technol. 37: 624-628, 1974.

16. BROWN, D.F. & TWEDT, R. — Assessment of the sanitary effectiveness of holding temperatures on beef cooked at low temperature. Appl. Microbiol. 24: 599-603, 1972.

17. BRYAN, F.L. — What the sanitarian should know about Clostridium perfringens. foodborne illness. J. Milk Food Technol. 32: 381-389, 1969.
18. BRYAN, F.L. & MCKINLEY, T.W. — Prevention of foodborne illness by time-temperature control of thawing, cooking, chilling and reheating turkeys in school lunch kitchens. J. Milk Food Technol. 37: 420-429, 1974.
19. BRYAN, F.L.; MCKINLEY, T.W. & MIXON, B. — Use of time-temperature evaluations in detecting the responsible vehicle and contributing factors of foodborne disease outbreaks. J. Milk Food Technol. 34: 576-582, 1971.
20. BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E., ed.— Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. USA, The Williams & Wilkins Company, 8^a ed, 1974.
21. BUROW, H. — Clostridium perfringens contamination of chilled sea fish and mussels in Turkey. Archiv für Lebensmittelhygiene 25: 39-42, 1974 (em alemão). Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol. 6, nº 7, 7R400, 1974).
22. BUROW, H. — An investigation of Clostridium perfringens - infested, cooled sea fish and mussels from Turkey. Arch Lebensmittelhyg. 25: 39-42, 1974. (em alemão). Apud: Aquatic Sciences & Fisheries Abstracts (vol. 4, nº 8, 4Q7738M).
23. BUSTA, F.F. & SCHRODER, D. J. — Effect of soy proteins on the growth of Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 22: 177-183, 1971.
24. BUSTA, F.F. & SMITH, L.B. — Influence of food protein on germination of C. perfringens spores. Abstracts Annual Meeting American Society Microbiology, 1972. Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol. 6, nº 9, 1974).

25. CHAPMAN, C.H. — The isolation and estimation of Clostridium welchii. J. Bact. 16: 49-56, 1928.
26. COLEE, J.G.; KNOWLDEN, J.A. & HOBBS, B.C. — Studies on the growth, sporulation and carriage of Clostridium welchii with special reference to food poisoning strains. J. Appl. Bact. 24: 326-339, 1961.
27. COLLINS, C.H. — Metodos microbiologicos. Zaragoza, Editorial Acribia, 1969. (Trad. do inglês).
28. CRAVEN, S.E. & LILLARD, H.S. — Effect of microwave heating of precooked chicken on Clostridium perfringens. J. Food Sci. 39: 211-212, 1974.
29. CRAVEN, S.E.; LILLARD, H.S. & MERCURI, A.J. — Survival of Clostridium perfringens during preparation of precooked chicken parts. J. Milk Food Technol. 38: 505-508, 1975.
30. CROSS, W.R. & NAKAMURA, M. — Localization of lecithinase activity in Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 16: 1802-1803, 1968.
31. CRUIKSHAANK, R., ed. — Medical Microbiology. 11^a edição, Baltimore, Williams & Williams Company, 1965 (p. 311-319).
32. DALY, C.; SANDINE, W.E. & ELLIKER, P.R. — Interaction of food starter cultures and food-borne pathogens: Streptococcus diacetylactis versus food pathogens. J. Milk Food Technol. 35: 34-357, 1972.
33. DENNIS, B.F.; KUNKLE, L.E.; OCKER, H.W.; BORTON, R.J. & CAHILL, V.R. — Influence of processing procedures on total count, presumptive coliforms and Clostridium perfringens in beef for further cooking. J. Food Sci. 37: 494-495, 1972.

34. DEWORK JR., F.M. — Sporulation of Clostridium perfringens type A in vacuum-sealed meats. Appl. Microbiol. 24: 834-836, 1972.
35. DUNCAN, C.L. — Clostridium perfringens food poisoning. J. Milk Food Technol. 33: 35-41, 1970.
36. DUNCAN, C. & FOSTER, E.M. — Effect of sodium nitrite, sodium chloride, and sodium nitrate on germination and outgrowth of anaerobic spores. Appl. Microbiol. 16: 406-411, 1967.
37. DUNCAN, C.L. & FOSTER, E.M. — Nitrite-induced germination of putrefactive anaerobe 3679h spores. American Society for Microbiology 10: 412-416, 1967.
38. DUNCAN, C.L. & STRONG, D.H. — Clostridium perfringens type A food poisoning. I Response of the rabbit ileum as an indication of enteropathogenicity of strains of C. perfringens in monkeys. Infect. Immunity 3: 167-170, 1971.
39. DUNCAN, C.L. & STRONG, D.H. — Experimental production of diarrhea in rabbits with C. perfringens. J. Microbiol. 15: 765-770, 1969.
40. DUNCAN, C.L. & STRONG, D.H. — Ileal loop fluid accumulation and production of diarrhea in rabbits by cell free products of C. perfringens. J. Bact. 100: 86-94, 1969.
41. DUNCAN, C.L. & STRONG, D.H. — Improved medium for sporulation of Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 16: 82-89, 1968.
42. DUNCAN, C.L.; STRONG, D.H. & SEBALD, M. — Sporulation and enterotoxin production by mutants of Clostridium perfringens. J. Bact. 110: 378-391, 1972.
43. ELLNER, P. — A medium promoting rapid quantitative sporulation in Clostridium perfringens. J. Bact. 71: 495-496, 1956.
44. ERNST, H. — Clostridium perfringens in a pipeline, and its implication in spoilage of sausages. Fleisch 28: 214-215, 1974 (em alemão). Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol. 7, nº 9, 9S1295, 1975).
45. FINEGOLD, S.M.; SUGIHARA, P.T. & SUTTER, V.L. — Use of selective media for isolation of anaerobes from humans. In: SHAPTON, D.A. & BOARD, R.G., ed. — Isolation of anaerobes. Londres, Academic Press, 1971.
46. FISCHER, L.H.; STRONG, D.H. & DUNCAN, C.L. — Resistance of Clostridium perfringens to varying degrees of acidity during growth and sporulation. J. Food Sci. 35: 91-95, 1970.

47. Food Processing 36: 18, 1975 — Canada proposes microbial standards for ground meat.
48. FUCHS, A.R. & BOND, G.J. The nutritional requirements of Clostridium perfringens. J. Gen. Microbiol. 16: 317-329, 1957.
49. FUTTER, B.V. & RICHARDSON — Anaerobic jars in the quantitative recovery of Clostridia. In: SHAPTON, D.A. & BOARD, R.G., ed. — Isolation of anaerobes. Londres, Academic Press, 1971.
50. FÜZI, M. & CSUKÁSS — New selective medium for the isolation of C. perfringens. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 16: 273-278, 1969.
51. GENIGEORGIS, C. & RIEMANN, H. — Clostridium perfringens toxicity (trabalho mimeografado apresentado ao 6º Simposio Internacional da Associação Mundial dos Veterinários Higienistas dos Alimentos, Elsinor, Dinamarca, 1973).
52. GENIGEORGIS, C.A. & RIEMANN, H. — Food safety and food poisoning. Food, Nutrition and Health 16: 363-397, 1973. (Impresso na Suíça, Basel).
53. GIBBS, P.A. — The detection of Clostridium welchii in the differential reinforced clostridia medium technique. J. Appl. Bact. 36: 23-33, 1973.
54. GIBBS, P.A. — The incidence of Clostridia in poultry processing plants. British poultry Science 12: 101-110, 1971. Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol. 5, nº 5, 5S531, 1973).
55. GOUGH, B.J. & ALFORD, J.A. — Effect of curing agents on the growth and survival of food-poisoning strains of Clostridium perfringens. J. Food Sci. 30: 1025-1028, 1965.
56. GUILLOU, J.P. & CHEVRIER, L. — Identification sérologique rapide de Clostridium perfringens par une microtechnique d'immunodiffusion sur lame. Bull. Acad. Vét. 45: 239-249, 1972.
57. HALBINGER, R.E. — The incidence of Clostridia. In: AYRES, J.C. et al., ed. — The Safety of Foods. Westport, Conn., The Avi Publishing Company, 1968. p. 111-115.
58. HALL, H.E. & ANGELOTTI, R. — Clostridium perfringens in meat and meat products. Appl. Microbiol. 13: 352-357, 1965.
59. HALL, H.E.; ANGELOTTI, R.; LEWIS, K. & FOTER, M.J. — Characteristics of Clostridium perfringens strains associated with food and food-borne disease. J. Bact. 85: 1094-1103, 1963.

60. HALL, H.E. & HAUSER, G. H. — Examination of feces from food handlers for Salmonellae, Shigellae, enteropathogenic Escherichia coli and Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 14: 928-933, 1966.
61. HALL, W.M.; WITZEMAN, J.S. & JANES, R. — The detection and enumeration of Clostridium perfringens in foods. J. Food Sci. 34: 212-214, 1969.
62. HANDFORD, P.M. — A new medium for the detection and enumeration of Clostridium perfringens in foods. J. Appl. Bact. 37: 559-570, 1974.
63. HANDFORD, P.M. & CAVETT - A medium for the detection and enumeration of Clostridium perfringens (welchii) in foods. J. Sci. Food Agric. 24: 487-492, 1973.
64. HANSSON, E. et. al. — changes occurring in foods when kept warm. Näringsforskning 16: 106-118, 1972. Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol 5, n^o 3, 3G129, 1975).
65. HARMON, S.M. & KAUTTER, D.A. — Collaborative study of the α -toxin method for estimating population levels of Clostridium perfringens in food. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 57: 91-94, 1974. Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol. 6, n^o 6, 6S736, 1974).
66. HARMON, S.M. & KAUTTER, D.A. — Method for estimating the presence of Clostridium perfringens in food. Appl. Microbiol. 20: 913-918, 1970.
67. HARMON, S.M.; KAUTTER, D.A. & PEELER, J.T. — Comparison of media for the enumeration of Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 21: 922-927, 1971.
68. HARMON, S.M.; KAUTIER, D.A. & PELLER, J.T. — Improved medium for the enumeration of C. perfringens. Appl. Microbiol. 22: 688-692, 1971.
69. HAUSCHILD, A.H.W. — Clostridium perfringens enterotoxin. J. Milk Food Technol. 34: 596-599, 1971.
70. HAUSCHILD, A.H.W. — Clostridium perfringens toxin types B, C, D and E. In: KADIS, S.; MONTIE, T. C. & AJL, S.J. — Microbial toxins. New York, Academic Press, 1971. Vol. II A, p. 159-188.
71. HAUSCHILD, A.H.W. — Enumeration of C. perfringens in foods: a review. J. Inst. Can. Technol. Aliment. 3: 82-84, 1970.
72. HAUSCHILD, A.H.W.; ERDMAN, I.E.; HILSHEIMER, R. & THATCHER, F. S. — Variations in recovery of Clostridium perfringens on commercial sulfite-Polymixin-sulfadiazine (SPS) agar. J. Food Sci. 32: 469-473, 1967.

73. HAUSCHILD, A.H.W. & HILSHEIMER, R — Enumeration of food-borne Clostridium perfringens in egg yolk-free tryptose-sulfite-cycloserine agar. Appl. Microbiol. 27: 521-526, 1974. Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol. 6, n° 8, 8S1020, 1974).
74. HAUSCHILD, A.H.W. & HILSHEIMER, R. — Evaluation and modifications of media for enumeration of Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 27: 78-82, 1974.
75. HAUSCHILD, A.H.W. & THATCHER, F.S. — Experimental food poisoning with heat-susceptible Clostridium perfringens type A. J. Food Sci. 32: 467-469, 1967.
76. HENDERSON, D.W. — The somatic antigens of the C. welchii group of organisms. J. Hyg. 40: 501-512, 1940.
77. HOBBS, B.C. — Clostridium perfringens and Bacillus cereus infections. In: RIEMANN, H., ed. Food-Borne Infections and Intoxications. New York, Academic Press, 1972. p. 131-173.
78. HOBBS, B.C. — C. welchii as a food poisoning organism. J. Appl. Bact. 28: 74-82, 1965.
79. HOBBS, B.C. — Food poisoning and food hygiene. 2nd ed., London, Edward Arnold, 1970.
80. HOBBS, B.C. — Microbiological standards for foods. London, The British Food Manufacturing Industries Research Associations, 1973. (Technical circular n° 534, paper presented at the Joint Meeting of the Meat & Fish Products Panel & The Microbiology Panel).
81. HOBBS, B.C.; SMITH, M.E.; OAKLEY, C.L.; WARRACK, G.H. & CRUICKSHANK, J.C. — Clostridium welchii food poisoning. Journal Hyg. 51: 75-101, 1953.
82. HOBBS, B.C. & SUTTON, R.G.A. — Clostridium perfringens food poisoning. Ann. Inst. Pasteur, Lille 19: 29-39, 1968.
83. HOBBS, G.; WILLIAMS, K. & WILLIS, A.T. — Basic methods for the isolation of clostridia. In: SHAPTON, D.A. & BOARD, R. G., ed. — Isolation of Anaerobes. Londres, Academic Press, 1971. p. 1-23. (The Society for Applied Bacteriology, Technical series n° 5).
84. IENISTEA, C. & ROMAN, A. — Occurrence of clostridia in meat and meat products. Industria Alimentara 25: 135-140, 1974. (em rumeno) Apud: Food Science and Technology Abstracts: (vol. 6, 8S979, 1974).
85. INAL, T.; HILDEBRANDT, G. & SIEMS, H. — Clostridium as indicator of water pollution using a harbour town in Turkey as example. Zentralblatt für Veterinärmedizin, B 21:

159-170, 1974 (em alemão). Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol 7, nº 6, 6R280, 1975).

86. INGLATERRA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PEIXE E ALIMENTOS — The Food Hygiene (General) Regulation 1970.
87. INTERNATIONAL ASSOCIATION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES, International Committee on Microbiological Specifications for Foods — Micro-organisms in foods: Their significance methods of enumeration. Canada, University of Toronto Press, 1968.
88. ISPOLATOVSKAIA, M.V. — Type A Clostridium perfringens toxin). In: KADIS, S.; MONTIE, T.C. & AJL, S.J., ed. — Microbial Toxins. New York, Academic Press, 1971. Vol. II A, p. 109-158.
89. KAFEL, S. & AYRES, J.C. — Importance of Clostridium perfringens in foods. In: Brd International Congress of Food Science & Technology, Washington, 1970. p. 665-668.
90. KHAZANOVA; V.V. — Propagation and survival of C. perfringens in food products. Voprosy Pitaniya 27: 63-67, 1968. Apud: Food Science and Technology Abstracts (Vol. 1, nº 2, 2C58, 1969).
91. KIM, C.H.; CHENEY, R. & WOODBURN, M. — Sporulation of Clostridium perfringens in a modified medium and selected foods. Appl. Microbiol 15: 871-876, 1967.
92. KLOTZ, A.W. — Application of FA Techniques to detection of Clostridium perfringens. Public Health Rept. (U.S.) 80: 305-311, 1965.
93. KNOX, R. & MACDONALD, E.K. — Outbreaks of food poisoning in certain Leicester institutions. The Med. Offr. 69: 21-22, 1943.
94. LABBE, R.G. & DUNCAN, C.L. — Growth from spores of Clostridium perfringens in the presence of sodium nitrite. Appl. Microbiol. 19: 353-359, 1970.
95. LADIGES, W.C.; FOSTER, J.F. & GANZ, W.M. — Incidence and viability of Clostridium perfringens in ground beef. J. Milk Food Technol. 37: 622-623, 1974.
96. LEITÃO, M.F.F.; DELAZARI, I. & MAZZONI, H. — Microbiologia de alimentos desidratados. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos 5: 223-239, 1974.
97. LILLARD, H.S. — Contamination of blood system and edible parts of poultry with Clostridium perfringens during water scalding. J. of Food Sci. 38: 151-154, 1973.
98. LILLARD, H.S. — Occurrence of Clostridium perfringens in broiler processing and further processing operations. J.

- of Food Sci. 36: 1008-1010, 1971.
99. LISTON, J. — Sanitation and the seafood industry. Association of Food & Drug Officials of The United States — Quarterly Bulletin 34: 158-162, 1970.
 100. LOWBURI, E.J.L. & LILLY, H.A. — Contamination of operating theatre air with C. tetani. British Medical Journal: 1334-1336, 1958.
 101. LOWIS, M.J. — A semi-quantitative procedure for detecting C. welchii in foodstuffs. J. Fd. Technol. 6: 171-177, 1971.
 102. LYNCH, K.L. & MOSKOWITZ, M. — Relationship of route of inoculation and nature of toxin preparation to bioassay of Clostridium perfringens α -toxin in mice. J. Bacteriol. 96: 1920-1924, 1968.
 103. MARSHALL, R.S.; STEENBERGEN, J.F. & McCLUNG, L.S. — Rapid Technique for the enumeration of Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 13: 559-563, 1965.
 104. MASTROENI, I. & TARSITANI, G. — Ricerca di portatori sani di C. perfringens a spore termoresistenti nel personale addetto ad una industria alimentare. Nuovi Annali d'Igiene e microbiologia 21: 512-520, 1970.
 105. MATCHES, J. R. & LISTON, J. — Mesophilic Clostridia in Puget Sound. Can. J. Microbiol. 20: 1-7, 1974.
 106. MATCHES, J.R.; LISTON, J. & CURRAN, D. — Clostridium perfringens in the environment. Appl. Microbiol. 28: 655-660, 1974.
 107. McCLUNG, L.S. — Human food poisoning due to growth of Clostridium perfringens (C. welchii) in freshly cooked chicken: preliminary note. J. Bact. 50: 229-231, 1945.
 108. McCLUNG, L.S. & TOABE, R. — The egg yolk plate reaction for the presumptive diagnoses of Clostridium sporogenes and certain species of the gangrene and botulinum groups. J. Bact. 53: 139-147, 1947.
 109. McKILLOP, E.J. — Bacterial contamination of hospital food, with special reference to C. welchii food poisoning. J. Hyg. 57: 31-46, 1959.
 110. MEAD, G.C. & IMPEY, C.S. — The distribution of Clostridia in poultry processing plants. British Poultry Science 11: 407-414, 1970.
 111. MILAV, M. & KOVACHEV, A. — Microbiological and biochemical studies of semi-manufactured meat products. I. Microflora of minced meat. Veterinarnomeditsinski nauki 7: 53-62, 1970. (em búlgaro). Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol 2, nº 7, 7S629, 1970).

112. MILLES, A.A. & MISRA, S.S. — The estimation of the bactericidal power of the blood. J. Hyg. Camb. 38: 732, 1938.
113. MOSSEL, D.A.A.; DE BRUIN; VAN DIEPEN, H.M.J.; VENDRIG, C.M.A. & ZOUTEWELLE, C. — The enumeration of anaerobic bacteria, and of Clostridium species in particular, in foods. J. Appl. Bacteriol. 19: 142-154, 1956.
114. MOSSEL, D.A.A. & POUW, H. — Studies on the suitability of sulphite cycloserine agar for the enumeration of Clostridium perfringens in food and water. 2bl Bak^t Hyg, I. Abt. Orig. A 223: 559-561, 1973.
115. MOSSEL, D.A.A. & QUEVEDO, F. — Control Microbiologico de los Alimentos. Lima, Serie de monografias del Cleiba, 1967.
116. MOSSEL, D.A.A. & WAART, J. — The enumeration of clostridia in foods and feeds. Ann. Inst. Pasteur 19: 13-27, 1968.
117. MURRELL, T.G.C.; EGERTON, J.R., RAMPLING, A; SAMELS, J. & WALKER, P.D. — The ecology and epidemiology of the pig-bel syndrome in man in New Guinea. J. Hyg. 64: 375-396, 1966.
118. MURRELL, T.G.C.; ROTH, L., EGERTON, J.; SAMELS, J. & WALKER, P.D. — Pig-bel: enteritis necroticans. The Lancet 29: 217-222, 1966.
119. NAKAMURA, M.; COOK, J. A. & CROSS, W. — Lecithinase production by Clostridium perfringens in chemically defined media. Appl. microbiol. 16: 1420-1421, 1968.
120. NAKAMURA, M. & CROSS, W.R. — The lecithinase (α -toxin) activity of strains of Clostridium perfringens. P.S.E.B.M. 127: 719-722, 1968.
121. NAKAMURA, M. & KELLY, K.D. — Clostridium perfringens in dehydrated soups and sauces. J. Food Sci. 33: 424-426, 1968.
122. NAKAMURA, M.; SCHULTZE, J.A. & CROSS, W.R. — Factors affecting lecithinase activity and production in C. welchii. J. Hyg. 67: 153-162, 1969. Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol. 1, n^o 6, 6B277, 1969).
123. NARAYAN, K.G. — Studies on clostridia incidence in the beef cattle. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 16: 65-72, 1966.
124. NICHIPERUK, V. — Clostridium perfringens in the course of production and storage of sausages. MYASNAYA INDUSTRIYA SSSR 39: 34-36, 1968. Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol. 1, n^o 3, 3S228, 1969).
125. PAREKH, K.G. & SOLBERG, M. — Comparative growth of Clostridium perfringens in carbon dioxide and nitrogen atmospheres. J. Food Sci. 35: 156-159, 1970.

126. PERIGO, J.A. & ROBERTS, T.A. — Inhibition of Clostridia by nitrite. J. Food Technol. 3: 91-94, 1968. Apud: Food Science and Technology Abstracts (Vol. 1, n^o 3, 3C80, 1969).
127. PIVNICK, H.; ERDMANN, I.E.; MICKLEA, G.; et al. — Retailing of barbecued chicken - a canadian survey. Canadian Journal of Public Health 59: 380-384, 1968. Apud: Food Science and Technology Abstracts (Vol. 1, (4) 4C148, 1968).
128. PONCELET, F. & CATTEAU, M. — Enterotoxic Clostridium perfringens: Specific nature of the strains and how to place the enterotoxic power in a prominent position. IV Internatio-
nal Congress of Food Science and Technology: 20-21, 1974. Apud: Food Science and Technology Abstracts (Vol. 7, n^o 4, 4C135, 1975).
129. REY, C.R.; KRAFT, A.A. & RUST, R.E. — Microbiology of beef shell frozen with liquid nitrogen. J. Food Sci. 36: 955-958, 1971.
130. REY, C.R.; WALKER, H.W. & ROHRBAUGH, P.L. — The influence of temperature on growth, sporulation and heat resistance of spores of six strains of Clostridium perfringens. J. Milk Food Technol. 38: 461-465, 1975.
131. RIHA, W.E. — Sodium nitrite inhibition of Clostridium perfringens. Dissertation Abstracts 33: 1603, 1972. Apud: Food Science and Technology Abstracts (Vol. 5, n^o 4, 4B35, 1973).
132. RIHA, W.E. JR. & SOLBERG, M. — Chemically defined medium for the growth of Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 22: 738-739, 1971.
133. RIHA JR., W.E. & SOLBERG, M. — Clostridium perfringens growth in a nitrite containing defined medium sterilized by heat or filtration. J. Food Sci. 40: 443-445, 1975.
134. RIHA JR., W.E. & SOLBERG, M. — Clostridium perfringens inhibition by sodium nitrite as a function of pH, inoculum size and heat. J. Food Sci. 40: 439-442, 1975.
135. RIHA, W.E. & SOLBERG, M. — Instability of sodium nitrite in a chemically defined microbiological medium. J. Food Sci. 38: 1-3, 1973.
136. ROBE, K. — Bacterial standards for foods — Do they work? Food Processing 36: 22-24, 1975.
137. ROBERTS, D. — Observation on procedures for thawing and spit-roasting frozen dressed chickens, and post cooking care and storage: with particular reference to food-poisoning bacteria. J. Hyg., Camb. 70: 565-588, 1972.

138. ROBERTS, T.A. & HOBBS, G. — Low temperature growth characteristics of Clostridia. J. appl. Bact. 31: 75-88, 1968.
139. ROCKLAND, L.B.; GARDINER, B.L. & PIECZARKA, D. — Stimulation of gas production and growth of Clostridium perfringens type A (n^o 3624) by legumes. J. Food Sci. 34: 411-414, 1969.
140. SALANITRO, J.P.; BLAKE, I.G. & MUIRHEAD, P.A. — Studies on the cecal microflora of commercial broiler chickens. Appl. Microbiol. 28: 439-447, 1974.
141. SATERLEE, L.D. & WALKER, H.W. — Response of white mice to cells and culture constituents of Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 18: 240-244, 1969.
142. SCHRODER, D.J. — Effect of natural and modified food components on Clostridium perfringens. Dissertation Abstracts International B34: 2084, 1973. Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol. 6, 1974, n^o 9, 9B63).
143. SCHRODER, D.J. & BUSTA, F.F. — Change in growth rate of Clostridium perfringens in food protein previously to proteolytic bacilli. Abstracts of the annual meeting of the american society for microbiology 72: 5, 1972. Apud: Food Science and Technology Abstracts. (vol. 6, n^o 9, 9B67, 1974).
144. SCHRODER, D.J. & BUSTA, F.F. — Glucose inhibits growth of Clostridium perfringens in food proteins. J. Milk Food Technol. 37: 4-10, 1974.
145. SCHRODER, D.J. & BUSTA, F.F. — Growth of Clostridium perfringens in food protein previously exposed to proteolytic bacilli. Appl. Microbiol. 26: 675-681, 1973. Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol. 6, 1974, n^o 4, 4B39).
146. SCHRODER, D.J. & BUSTA, F.F. — Growth of Clostridium perfringens in meat loaf with and without added soybean protein. J. Milk Food Technol. 34: 215-217, 1971.
147. SEBALD, M. & COSTILOW, R.N. — Minimal growth requirements for Clostridium perfringens and isolation of auxotrophic mutants. Appl. Microbiol. 29: 1-16, 1975.
148. SCHULTZE, J.A. & NAKAMURA, M. — Haemolytic activity of the alpha and theta toxin of C. welchii. J. Hyg. 67: 163-174, 1969. Apud: Food Science and Technology Abstracts (Vol. 1, n^o 6, 6B278, 1969).
149. SELIGMAN, R. — Incidence and quantity of Clostridium perfringens in meat and other foodstuffs. Refuah verinarith 30: 4-10, 1973. Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol. 6, n^o 8, 8c280, 1974).

150. SELIGMANN, R. & FRANK-BLUM, H. — Microbial quality of barbecued chickens from commercial rotisseries. J. Milk Food Technol. 37: 473-476, 1974.
151. SHAHIDI, S.A. & FERGUSON, A.R. — New quantitative, qualitative, and confirmatory media for rapid analysis of food for Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 21: 500-506, 1971.
152. SIDORENKO, G.I.; PIVOVAROV, Yu. P. & NICHIPORUM — [Possible ways of contamination by C. perfringens]. Gigiena e Sanitaryia 34: 100-101, 1969 (em russo). Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol. 1, n° 9, 9S597, 1969).
153. SKINNER, F.A. — The isolation of soil clostridia. In: SHAPTON, D.A. & BOARD, R.G., ed. — Isolation of anaerobes. London, Academic Press, 1971. p. 57-80.
154. SKJELKVALE, R. & DUNCAN, C.L. — Characterization of enterotoxin purified from Clostridium perfringens type C. Infection and Immunity 5: 1061-1068, 1975.
155. SMITH, L.D.S. — Clostridium perfringens food poisoning. In: SLANETZ, L.W. et al., ed. — Microbiological Quality of Foods. New York, Academic Press, 1963. p. 77-83.
156. SMITH, L.D.S. — Factors affecting the growth of Clostridium perfringens. In: 3rd International Congress of Food Science & Technology, Washington, 1970. p. 661-664.
157. SMITH, L.D.S. — Factors involved in the isolation of C. perfringens. J. Milk Food Technol. 35: 71-76, 1972.
158. SMITH, L.D.S. — Inhibition of Clostridium botulinum by strains of Clostridium perfringens isolated from soil. Appl. Microbiol. 30: 319-323, 1975.
159. SOHN, J.Y.; RYEOM, K.; KIM, Y.H.; LEE, M.W.; ON, O. & RYU, J.K. — [A study on the distribution of Clostridium welchii in fishes and shellfishes in Korea]. Report of the National Institute of Health 10: 79-88, 1973 (em coreano). Apud: Food Science and Technology Abstracts (vol. 7, 1975, n° 9, 9R505, 1975).
160. SOLBERG, M. & ELKIND, B. — Effect of processing and storage conditions on the microflora of Clostridium perfringens - inoculated Frankfurters. J. Food Sci. 35: 126-129, 1970.
161. STARK, R.L. & DUNCAN, C.L. — Biological characteristics of C. perfringens type A enterotoxin. Infect immunity 4: 89-96, 1971.
162. STERNE, M. & WARRACK, G.H. — The types of Clostridium perfringens. The Journal of Pathology and Bacteriology 88: 279-283, 1964.

163. STRONG, D.H. & CANADA, J.C. — Survival of Clostridium perfringens in frozen chicken gravy. J. Food Sci. 29: 479-482, 1964.
164. STRONG, D.; CANADA, J.C. & GRIFFITHS, B. — Incidence of Clostridium perfringens in american foods. Appl. Microbiol. 11: 42-44, 1963.
165. STRONG, D.H.; FOSTER, E.F. & DUNCAN, C.L. — Influence of water activity on the growth of Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 19: 980-987, 1970.
166. SUTTON, R.G.A. — Distribution of heat-resistant Clostridium welchii in a rural area of Australia. J. Hyg; Camb. 64: 65-74, 1966.
167. SUTTON, R.G.A.; GHOSH, A.C. & HOBBS, B.C. — Isolation and enumeration of Clostridium welchii from food and faeces. In: SHAPTON, D.A. & BOARD, R.G., ed. — Isolation of anaerobes. Londres, Academic Press, 1971. p. 39-47 (The Society for Applied Bacteriology, Technical series n° 5).
168. SUTTON, R.G.A. & HOBBS, B.C. — Food poisoning caused by heat-sensitive Clostridium welchii. A report of five recent outbreaks. J. Hyg 66: 135-146, 1968.
169. SUTTON, R.G.A.; KENDALL, M. & HOBBS, B.C. — The effect of two methods of cooking and cooling on Clostridium welchii and other bacteria in meat. J. Hyg, Camb. 70: 415-424, 1972.
170. SYLVESTER, P.K. & GREEN, J. — The effects of different types of cooking on artificially infected meat. Med. Offr. 105: 231-235, 1961.
171. TABATABAI, L.B. & WALKER, H.W. — Inhibition of Clostridium perfringens by Streptococcus faecalis in a medium containing curing salts. J. Milk Food Technol. 37: 387-391, 1974.
172. TABATABAI, L.B. & WALKER, H.W. — Oxidation-reduction potential and growth of Clostridium perfringens and Pseudomonas fluorescens. Appl. Microbiol. 20: 441-446, 1970.
173. TAYLOR, A.W. & GORDON, W.S. — A survey of the types of C. welchii present in soil and in intestinal contents of animals and man. J. Pathol. Bacteriol. 50: 271-276, 1940.
174. TOMPKIN, R.B; CHRISTIANSEN, L.N.; SHAPARIS, A.B. & BOLIN, H. — Effect of potassium sorbate on salmonellae, Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens and Clostridium botulinum in cooked, uncured sausage. Appl. Microbiol. 28: 262-264, 1974.

175. TRACI, P.A. & DUNCAN, C.L. — Cold shock lethality and injury in Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 28: 815-821, 1974.
176. TUOMI, S.; MATTHEWS, M.E. & MARTH, E.H. — Behavior of Clostridium perfringens in precooked chilled ground beef gravy during cooling, holding and reheating. Journal Milk Food Technol. 37: 494-498, 1974.
177. TUOMI, S.; MATTHEWS, M.E. & MARTH, E.H. — Temperature and microbial flora of refrigerated ground beef gravy subjected to holding and heating as might occur in a school food service operation. J. Milk Food Technol. 37: 457-462, 1974.
178. UEMURA, T.; SAKAGUSHI, G. & RIEMANN, H.P. — In vitro production of Clostridium perfringens enterotoxin and its detection by reversed passive hemagglutination. Appl. Microbiol. 26: 381-385, 1973.
179. U.S.A. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION, AND WELFARE. PUBLIC HEALTH SERVICE. CENTER FOR DISEASE CONTROL. — Guide for Investigating Foodborne Disease Outbreaks and Analyzing surveillance Data. Atlanta, Georgia, 1972.
180. VECCHIO, V. del; D'ARCA, S.U.; SIMONETTI, A.D. & MASTROENI, I. — Indagini sulla persistenza nel tempo del C. perfringens in un campione di carne naturalmente contaminata conservata a +4°, e sulla termoresistenza. Nuove annali d'igiene e microbiologia 20: 477-485, 1969.
181. VIRGINIA POLYTECHNIC INSTITUTE AND STATE UNIVERSITY, The staff of the anaerobe laboratory — Anaerobe Laboratory Manual. Blacksburg, Virginia, 1972.
182. WAART, J. & SMIT, F. — The enumeration of obligately anaerobic bacteria using punches made from plastics with a low oxygen permeability. Lab. Prac. 16: 1098-1105, 1967.
183. WALKER, P.D.; HARRIS, E. & MOORE, W.B. — The isolation of clostridia from animal tissues. In: SHAPTON, D.A. & BOARD, R.G., ed. — Isolation of anaerobes. Londres, Academic Press, 1971. p.25-38 (The Society for Applied Bacteriology, Technical series, n° 5).
184. WASSERMAN, AARON E. & HUHTANEN, CHARLES N. — Nitrosamines and the inhibition of Clostridia in medium heated with sodium nitrite. J. Food Sci. 37: 785-786, 1972.
185. WEISS, K.F. & STRONG, D.H. — Some properties of heat-resistant and heat-sensitive strains of Clostridium perfringens. J. Bact. 93: 21-26, 1967.
186. WHITE, A. & HOBBS, B.C. — Refrigeration as a preventive measure in food poisoning. Roy. Soc. Health J. 83: 111-114, 1963.

187. WILLIS, A.T. — Some diagnostic reactions of Clostridia.
Laboratory Practic : 526-530, 1962.
188. WILLIS, A.T. & HOBBS, G.— A medium for the identification of Clostridia producing opalescence in egg-yolk emulsions.
J. Path. Bact. 75: 299-305, 1958.
189. WILLIS, A.T. & HOBBS, G. — A modified Nagler medium. Nature
180: 92-93, 1957.
190. WILLIS, A.T. & HOBBS, G. — Some new media for the isolation and identification of Clostridia. J. Path. Bact. 77: 511-521, 1959.
191. WILSON, W.J. & BLAIR, E.M. M'V — The application of a sulphite-glucose-iron agar medium to the quantitative estimation of C. welchii and other reducing bacteria in water supplies. J. Path. Bact. 27: 119-122, 1924.
192. WOODBURN, M. & CHUNG, H. KIM — Survival of Clostridium perfringens during baking and holding of turkey stuffing. Appl. Microbiol. 14: 914-920, 1966.
193. YORK, G.K. — Correlative effects of pH, temperature, and salt activity on growth of Clostridium perfringens. In: FOOD PROTECTION AND TOXICOLOGY CENTER: Food-Borne Infections and Intoxications - A four-year summary report. California, University of California, 1969.
194. ZAGAEVSKII, I.S. — Beef contamination by C. perfringens. Veterinariya, Moscow 1: 101-103, 1973 (em Russo) Apud: Food Scienc and Technology Abstracts (vol. 6, n^o 3, 35322, 1974).