

D Á C I O D E A L M E I D A C H R I S T O V ã O

CONTAMINAÇÃO DE ALFACE (LACTUCA SATIVA) POR MICRORGANISMOS DE ORI -
GEM FECAL: ESTUDO DE MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS PARA SUA DETERMINAÇÃO,
MEDIDA DE SUA INTENSIDADE NA CIDADE DE SÃO PAULO E EFICIÊNCIA DE
ALGUNS TRATAMENTOS NA SUA REDUÇÃO.

Tese de concurso para Catedrático
de Microbiologia e Imunologia Apli-
cadas da Faculdade de Higiene e Saú
de Pública da Universidade de São
Paulo.

Trabalho efetuado no Departamento de Microbiologia da
Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

1958.



616.022
01

ERRATA

- Pág. 9 - 15ª linha: Onde se lê "Portanto, êsses índices de prevalên-
cia das enteroparasitoses também sofrem restrição" leia-se
"Portanto, a informação dada por êsses índices de prevalên-
cia das enteroparasitoses também sofre restrição".
- 24ª linha: Onde se lê "Entre essas deficiências" leia-se
"Entre as deficiências".
- Pág. 10 - 16ª linha: Onde se lê "o quoefficiente" leia-se "o coefici-
ente"
- Pág. 12 - Penúltima linha: Onde se lê "no que se refere a êste grupo
de moléstias " leia-se "no que se refere a todo o grupo de
moléstias e chamaram a atenção sôbre a necessidade de es-
tudos para o esclarecimento da ação que numerosos fatores
podem estar exercendo nesse problema.
- Pág. 14 - 11ª linha: Onde se lê "foram" leia-se "forem".
- Pág. 15 - 1ª linha: Onde se lê "Floyd e colaboradores" leia-se "Floyd
e colaboradores (47a, 47b, 47c, 80a, 80b, 80c e 80d)".
- 2ª linha: Onde se lê "1954, 1955, 1956 e 1957" leia-se
"1954, 1955 e 1956".
- Pág. 17 - No Quadro B, título da 2ª coluna: Onde se lê "Nº de crian-
ças na idade entre 4 semanas e 1 ano" leia-se "Nº de crian-
ças na idade entre 4 semanas e 2 anos".
- Ainda na 2ª coluna: Onde se lê "3.258.460, 618.460, 720.648,
764.364, 70.633, 185.629, 587.319" leia-se, respectivamen-
te, "6.832.710, 1.282.470, 1.515.948, 1.640.414, 207.989,
378.000, 587.319."
- Na 3ª coluna: Onde se lê " 4.242, 514, 587, 6.396, 32, 208,
11.294" leia-se "3.977, 488, 565, 6.101, 27, 192, 11.294".
- Na 4ª coluna: Onde se lê "17,5" (coeficiente da Suécia)
leia-se "13,0".
- Pág. 18 - 10ª linha: Onde se lê "estudo já referido ()" leia-se
"estudo já referido (218)".
- Pág. 20 - Última linha: Onde se lê "grande contaminação dessa horta-
liça em São Paulo" leia-se "grande contaminação dessa horta-
liça em São Paulo e sôbre a medida do valor da lavagem
e de alguns métodos de desinfecção na redução dessa mesma
contaminação".
- Pág. 26 - 8ª linha: Onde se lê "bem como" leia-se "como".
- Pág. 28 - 9ª linha: Onde se lê "Entretanto, impossível" leia-se "En-
tretanto, é impossível".
- 23ª linha: Onde se lê "Jordan, Russell e Zeit" leia-se
"Jordan, Kussell e Zeit (92)".
- Pág. 32 - 25ª linha: Onde se lê "Houston" leia-se "Houston (85)".
- Pág. 33 - 3ª linha: Onde se lê "Flu" leia-se "Flu (48)".
- 13ª linha: Onde se lê "Lahiri, Das e Malik" leia-se "Lahi-
ri, Das e Malik (112)".
- Pág. 34 - 22ª linha: Onde se lê "porém, ao invés" leia-se "porém, se
ao invés".
- Pág. 35 - 9ª linha: Onde se lê "abamaram " leia-se "já chamaram".
- Pág. 37 - 24ª linha: Onde se lê "Que de um" leia-se "De um".
- Págs. 48 e 50 - Leia-se o primeiro parágrafo da página 50 após o se-
gundo parágrafo da página 48, antes da menção ao estudo de
Mills, Bartlett e Kessel.

- Pág. 52 - 21ª linha: Onde se lê "amostras de aipo" leia-se "amostras de aipo, cultivado em horta irrigada com água poluída por esgotos".
- Pág. 59 - 6ª linha: Onde se lê "Christiansen e Jensen" leia-se "Christiansen e Jepsen (25)".
- Pág. 60 - Os 2ª, 3ª e 4ª parágrafos constituem uma única nota de rodapé, intercalada na citação do trabalho de Jensen, o qual continua à página 61.
- Pág. 65 - 6ª linha: Onde se lê "Mc Clure e Langmuir" leia-se "Mc Clure e Langmuir (121)".
 - 11ª linha: Onde se lê "c Melnick (121)" leia-se "e Melnick (84)".
 - 23ª linha: Onde se lê "e Casey (84)" leia-se "e Casey (171)".
- Pág. 67 - 19ª linha: Onde se lê "Schultz e Robinson" leia-se "Schultz e Robinson (174)".
- Pág. 76 - Entre 3ª e 4ª linhas leia-se o título "c) Vírus da hepatite infecciosa".
 - 13ª linha: Onde se lê "Hallgren" leia-se "Hallgren (72)".
 - 15ª linha: Onde se lê "Neef e Stokes" leia-se "Neef e Stokes (141)".
- Pág. 78 - 26ª linha: Onde se lê "Craig e Fornst" leia-se "Craig e Faust".
- Pág. 79 - 27ª linha: Onde se lê "Hoare (122)" leia-se "Hoare (82)".
- Pág. 81 - 16ª linha: Onde se lê "Penfold, Woodcock e Drew" leia-se "Penfold, Woodcock e Drew (153)".
- Pág. 82 - 21ª linha: Onde se lê "Laidlaw" leia-se "Laidlaw (38)".
- Pág. 83 - 1ª linha: Onde se lê "Spector, Baylis e Gullans (122)" leia-se "Spector, Baylis e Gullans (182)".
- Pág. 86 - 11ª linha: Onde se lê "em duas das quatro provas realizadas com 15 minutos de contato, e encontraram sobrevivência de cistos em uma das duas" leia-se "encontraram sobrevivência de cistos em duas das quatro provas realizadas com 15 minutos de contato e em uma das duas".
- Pág. 88 - 6ª linha: Onde se lê "Brown" leia-se "Brown (17)".
- Pág. 89 - 16ª linha: Onde se lê "tomando" leia-se "tomando-se".
 - 19ª linha: Onde se lê "menores" leia-se "maiores".
- Pág. 92 - 23ª linha: Onde se lê "Wang e Dunlop ()" leia-se "Wang e Dunlop (236)".
- Pág. 98 - 3ª linha: Onde se lê "Mc Crady ()" leia-se "Mc Crady (126 a)".
 - 4ª linha: Onde se lê "estatístico ()" leia-se "estatístico (45 a)".
 - 5ª linha: Onde se lê "Hoskins ()" leia-se "Hoskins (84 a)".
 - 7ª linha: Onde se lê "Stevens ()" leia-se "Stevens (183a)".
 - 10ª linha: Onde se lê "N.M.P. ()" leia-se "N.M.P. (25 a)".
 - 21ª linha: Onde se lê "Escherichia coli (225) (227) (229)" leia-se "Escherichia coli (225)(227) (230)".
- Pág. 99 - 6ª linha: Onde se lê "processo acima" leia-se "processo acima referido".
 - Penúltima linha: Onde se lê "Litsky, Mallmann e Fifield

- ()" leia-se "Litsky, Mallmann e Fifield (117 a)".
- Pág. 100 - 15ª linha: Onde se lê "enterococos" leia-se "estreptococos".
- 20ª linha: Onde se lê "3,3 vezes" leia-se "1,6 vezes".
- 21ª linha: Onde se lê "Kauffmann ()" leia-se "Kauffmann (95a)".
- Pág. 111 - Penúltima linha: Onde se lê "haviam" leia-se "se haviam".
- Pág. 112 - 4ª linha: Onde se lê "das fôlham" leia-se "das fôlhas. Uma vez que a densidade da mistura liquidificada nessas condições ainda era 0,78, o resultado obtido para a unidade de volume do liquidificado era multiplicado por 3,8 para referência à unidade de peso das fôlhas.
- Última linha: Onde se lê "Hoskins ()" leia-se Hoskins(84 a)".
- Pág. 120 - 2ª linha: Onde se lê "comparação" leia-se "comprovação".
- 3ª linha: Onde se lê "o qual" leia-se "no qual se introduziu uma correção devida à presença de ar no liquidificado".
- 4ª linha: Onde se lê "conforme resulta da investigação descrita neste capítulo, se demonstra" leia-se "Conforme resulta da investigação descrita neste capítulo, tal método se demonstra".
- Págs. 134, 135 e 136 - Quadro IX: A todos os resultados "0, 0, 0, 0, 0" corresponde o N.M.P., por lg de fôlhas, " 11,4" e não "11,4".
- Pág. 137 - 6ª linha: Onde se lê "assemelham" leia-se "assemelhavam".
- 27ª linha: Onde se lê "aquêles da identificação obtida a partir dessa cultura após o mesmo período" leia-se "aquêles obtidos da identificação dessas culturas após cada um desses períodos".
- Págs. 138 e 139 - Quadro X: A todos os resultados "0, 0, 0, 0, 0" corresponde o N.M.P., por lg de fôlhas; " 11,4" e não "11,4".
- Pág. 140 - 29ª linha: Onde se lê "aproximam igualmente dos valores considerados como verdadeiros" leia-se "aproximam dos valores considerados como verdadeiros em graus que, entre si, não diferem significativamente".
- Pág. 141 - 10ª linha: Onde se lê "não revele" leia-se "não revele significativamente".
- 18ª linha: Onde se lê "0,3855" leia-se "0,3182".
- 19ª linha: Onde se lê "0,03" leia-se "0,023".
- Penúltima linha: Onde se lê "estatisticamente significativo" leia-se "estatisticamente significativo, de grande intensidade".
- Pág. 143 - Quadro XI: Ao resultado "0, 0, 0, 0, 0" corresponde o N.M.P., por lg de fôlhas, " 11,4" e não "11,4".
- Pág. 145 - 11ª linha: Onde se lê "40" leia-se "36".
- 12ª linha: Onde se lê "significativo" leia-se "altamente significativo".
- 13ª linha: Onde se lê "0,03" leia-se "0,007".
- 20ª linha: Onde se lê "foi isolada uma cêpa que apresentou" leia-se "foram isoladas cêpas que apresentaram".
- Pág. 148 - 3ª linha: Onde se lê "durante 24 horas" leia-se "durante 24 horas, após enriquecimento em caldo lactosado".

- 7ª linha: Onde se lê "fôlhas mais externas" leia-se "fôlhas mais externas, sempre visivelmente sujas de detritos do solo".
 - 8ª linha: Onde se lê "as fôlhas mais centrais" leia-se "as fôlhas mais centrais, aparentemente livres, na maioria dos casos, de quaisquer detritos".
 - 10ª linha: Onde se lê "5 fôlhas" leia-se "5 fôlhas representativas".
 - 11ª linha: Onde se lê "fôlhas relacionadas" leia-se "fôlhas das mesmas alfaces, selecionadas".
 - 28ª linha: Onde se lê "0,0575, com limites fiduciais de 0,0210 e 0,1572" leia-se "0,2397, com limites fiduciais de 0,1400 e 0,4104".
 - 29ª linha: Onde se lê "a média geométrica é 0,0309, com limites fiduciais de 0,0066 e 0,1364" leia-se "a média geométrica é 0,1715, com limites fiduciais de 0,0761 e 0,3838".
- Págs. 151 e 152 - Quadro XIII: A todos os resultados "0, 0, 0, 0, 0" corresponde o N.M.P., por 100 g de fôlhas, "<8,5" e não "8,5".
- Pág. 153 - 2ª linha: Onde se lê "94" leia-se "76".
- 3ª linha: Onde se lê "97" leia-se "83".
 - 8ª linha: Onde se lê "10 fôlhas" leia-se "as 10 fôlhas".
 - 10ª linha: Onde se lê "diferentes grupos" leia-se "diferentes grupos (Quadro XIII A)".
 - 12ª linha: Onde se lê "em cada pé" leia-se "em cada pé. As fôlhas de todos os grupos eram lavadas cuidadosamente".
 - 14ª linha: Onde se lê "aquosa contendo 50 partes por milhão (I); hipoclorito de sódio em solução" leia-se "em água destilada, contendo 50 partes por milhão (I); hipoclorito de sódio em solução, também em água destilada".
 - 17ª linha: Onde se lê "na sua face interna (P)" leia-se "na face interna (P). A solução de hipoclorito, a fim de favorecer a ação germicida do cloro, era acidulada, com ácido acético, a pH 5,2, o pH da solução de iodo".
 - 20ª linha: Onde se lê "eram colocadas com água nos recipientes mencionados" leia-se "eram colocadas, também em cestas de arame, nos recipientes mencionados, os quais eram cheios com água destilada 2 - 3 horas antes da experiência".
 - 22ª linha: Onde se lê "mergulhado em recipientes para lavagem em água corrente durante 5 minutos" leia-se "transferido a recipientes para lavagem em água corrente durante 5 minutos, a fim de remover o agente desinfetante".
 - 25ª linha: Onde se lê "40, 80 e 120 minutos, respectivamente" leia-se "40, 80 e 120 minutos".
 - 32ª linha: Onde se lê "duplo quadrado latino" leia-se "duplo quadrado latino (Quadro XIII B)".
- Pág. 155 - 24ª linha: Onde se lê " $Y=(0,9875).10^{-0,0055t}$ " leia-se " $Y=10^{-0,0055t}$ ".
- 26ª linha: Onde se lê " $Y=(0,9891).10^{-0,0048t}$ " leia-se " $Y=10^{-0,0048t}$ ".
 - 28ª linha: Onde se lê " $Y=(0,9999).10^{-0,00013t}$ " leia-se " $Y=10^{-0,00013t}$ ".

- Págs. 156 a 165 - Quadro XV: Onde se lê "N.M.P. por lg de fôlhas" leia-se "N.M.P. por 100 g de fôlhas".
- Pág. 167 - 5ª linha: Onde se lê "parasitoses" leia-se "helminthiases".
- Pág. 168 - 2ª linha: Onde se lê "Dr. Celso Caldas" leia-se "Dr. Celso Caldas (219 a)".
- 22ª linha: Onde se lê "com esgotos" leia-se "com esgotos (228)".
 - 27ª linha: Onde se lê "ser estéreis" leia-se "ser estéreis (228)".
- Pág. 169 - 5ª linha: Onde se lê "Essas técnicas levadas" leia-se "As técnicas mais eficientes, levadas".
- 8ª linha: Onde se lê "bacterioida" leia-se "bactericida ou bacteriostático".
 - 25ª linha: Onde se lê " a se tomar" leia-se "a tomar".
- Pág. 170 - 14ª linha: Onde se lê "as médias dos" leia-se "as médias geométricas dos".
- 17ª linha: Onde se lê "de 90 a 95 para 1" leia-se "de 90-95 para 10-5".
- Pág. 172 - 2ª linha: Onde se lê "mostrou-se" leia-se "mostrou ser".
- 3ª linha: Onde se lê "94" leia-se "76".
 - 5ª linha: Onde se lê "97" leia-se "83".
 - 6ª linha: Onde se lê "densidade residual, porém, frequentemente atinge níveis elevados" leia-se "densidade residual - em média, de cerca de 20 por cento - frequentemente atinge níveis consideravelmente elevados".
 - Antepenúltima linha: Onde se lê "entretanto, também a aplicação desses tratamentos não constitui garantia absoluta de destruição das bactérias de origem fecal aí presentes" leia-se "entretanto, também a aplicação desses tratamentos, por tempos praticáveis, não constitui garantia absoluta de destruição das bactérias de origem fecal aí presentes, e, nos tempos experimentados, nem ao menos se mostra capaz de reduzir seu número a nível satisfatório".
- Pág. 175 - Acrescentar: 25a - CHRISTOVÃO, D. de A. - Comparação entre o caldo triptose-lauril e o caldo lactosado, na determinação do número de bactérias coliformes nas águas das praias dos municípios de Santos e São Vicente. Arq. Fac. Hig. Saú de Púb. 11; 135, 1957.
- Pág. 176 - Acrescentar: 45a - FERTIG, J.W. & HELLER, A.N. - The application of statistical techniques to sewage treatment processes. Biometrics, 6: 127, 1950.
- 47a - FLOYD, T.M. - The incidence of Shigella organisms in a group of Egyptian village children. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 3: 294, 1954.
 - 47b - FLOYD, T.M.; HIGGINS, A.R. & KADER, M.A. - Studies in shigellosis. V. The relationship of age to the incidence of Shigella infections in Egyptian children, with special reference to shigellosis in the newborn and in infants in the first six months of life. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 5: 119, 1956.
 - 47c - FLOYD, T.M.; BLAGG, J.W. & KADER, M.A. - Studies

- in shigellosis. VI. Observations on incidence and etiology of diarrheal disease in Egyptian adults. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.* 5: 812, 1956.
- Pág. 178 - Acrescentar: 80a - HIGGINS, A.R. & FLOYD, T.M. - Studies in shigellosis. I. General considerations, locale of studies, and methods. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.* 4: 263, 1955.
- 80b - HIGGINS, A.R.; FLOYD, T.M. & KADER, M.A. - Studies in shigellosis. II. Observations on incidence and etiology of diarrheal disease in Egyptian village children. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.* 4: 271, 1955.
 - 80c - HIGGINS, A.R.; FLOYD, T.M. & KADER, M.A. - Studies in shigellosis. III. A controlled evaluation of a monovalent *Shigella* vaccine in a highly endemic environment. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.* 4: 281, 1955.
 - 80d - HIGGINS, A.R.; FLOYD, T.M. & KADER, M.A. - Studies in shigellosis. IV. A controlled trial of sulfadiazine, dihydrostreptomycin and oxitetraacycline as long term prophylaxis agents in a highly endemic environment for shigellosis. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.* 4: 289, 1955.
 - 84a - HOSKINS, J.K. - Most probable numbers for evaluation of coli-aerogenes tests by fermentation tube method. *Publ. Health Rep.* 49: 393, 1934.
- Pág. 179 - Acrescentar: 95a - KAUFFMANN, W. - Tetrathionate broth base. *In* *Difco Manual*, 9th ed., Detroit, Difco Laboratories, 1953.
- Pág. 180 - Acrescentar: 117a - LITSKY, W.; MALLMANN, W.L. & FIFIELD, C.W. - A new medium for the detection of enterococci in water. *Amer. J. Pub. Health* 43: 873, 1953.
- 117b - LITSKY, W.; MALLMANN, W.L. & FIFIELD, C.W. - Comparison of the most probable numbers of *E.coli* and enterococci in river water. *Am. J. Pub. Health* 45: 1049, 1955.
- Pág. 181 - Acrescentar: 126a - McCRADY, M.H. - The numerical interpretation of fermentation tube results. *J. Infect. Dis.* 17: 183, 1915.
- Pág. 185 - Acrescentar: 183a - STEVENS, W.L. - *In* Fisher, R.A. & Yates, F. - *Statistical tables for biological, agricultural and medical research*, 4th ed. Edinburgh.
- Pág. 187 - Acrescentar: 219a - CALDAS, C. - Epidemia de febre tifóide, no Recife, originada pela ingestão de hortaliças cruas, contaminadas. *Arq. Hig.* 17: 7, 1947.

S U M M A R I O

INTRODUÇÃO

PARTE I

Capítulo ISOBREVIVENCIA DE BACILOS DO GENERO SALMONELLA EM ESGOTOSCapítulo IISOBREVIVENCIA DE BACILOS DO GENERO SALMONELLA NA ÁGUACapítulo IIISOBREVIVENCIA DE BACILOS DO GENERO SALMONELLA NO SOLOCapítulo IVSOBREVIVENCIA DE BACILOS DO GENERO SALMONELLA EM VEGETAISCapítulo VSOBREVIVENCIA DE BACILOS DA TUBERCULOSE EM ESGOTOSCapítulo VIVÍRUS DA POLIOMIELITE, COXSACKIE E DA HEPATITE INFECCIOSA:
PRESENÇA NAS FEZES, NOS ESGOTOS, NA ÁGUA E SUA RESISTENCIA.Capítulo VIIPARASITOS ANIMAIS: RESISTENCIA DE CISTOS DE PROTOZOÁRIOS
E OVOS DE HELMINTOS NO MEIO EXTERIOR.

PARTE II

Capítulo ITÉCNICAS BACTERIOLÓGICAS

- I - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE BACTÉRIAS COLIFORMES
- II - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ESCHERICHIA COLI
- III - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ENTEROCOCCOS
- IV - PESQUISA DE SALMONELAS

PARTE II (continuação)

Capítulo IIEFICIENCIA DE DIFERENTES METODOS PARA OBTENÇÃO DE BACTERIAS CONTAMINANTES DA ALFACE

- I - COMPARAÇÃO MEDIANTE A DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE COLIFORMES.
 - (a) - Métodos
 - (b) - Resultados
- II - COMPARAÇÃO MEDIANTE A DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ESCHERICHIA COLI
 - (a) - Métodos
 - (b) - Resultados
- III - CONCLUSÃO

Capítulo IIIINVESTIGAÇÃO SOBRE O GRAU DE CONTAMINAÇÃO DA ALFACE DISTRIBUIDA EM SÃO PAULO POR BACTERIAS DE ORIGEM FECAL E SOBRE MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS PARA SUA DETERMINAÇÃO.

- I - AMOSTRAGEM
- II - GRAU DE CONTAMINAÇÃO NOS DIFERENTES NÍVEIS CONCENTRICOS DE FOLHAS
 - (a) - Métodos
 - (b) - Resultados
- III - INTENSIDADE DE CONTAMINAÇÃO DAS AMOSTRAS COLHIDAS, CONFORME DETERMINAÇÃO POR DIFERENTES METODOS.
 - (a) - Determinação de coliformes

PARTE II (continuação)- Capítulo III

- (b) - Determinação de Escherichia coli
- (c) - Determinação de enterococos
- (d) - Pesquisa de salmonelas
- (e) - Nível médio de contaminação da alface em São Paulo por bactérias de origem fecal.

Capítulo IV

EFICIÊNCIA DE ALGUNS TRATAMENTOS NA REDUÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE ALFACE POR ESCHERICHIA COLI

I - LAVAGEM

- (a) - Métodos
- (b) - Resultados

II - DESINFECÇÃO

- (a) - Métodos
- (b) - Resultados

Capítulo V

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

BIBLIOGRAFIA

I N T R O D U Ç I O

Embora dentro de limites restritos, é conhecida entre nós, a alta prevalência das infecções e infestações cujos agentes etiológicos se eliminam pelas fezes e é sabido que tal fato constitui grande problema de saúde pública.

Na realidade, apenas entrevemos tal problema porquanto a pobreza de dados sobre sua extensão, intensidade e conseqüências é muito grande e, sob vários aspectos, absoluta.

Assim, de grande número dessas moléstias não conhecemos os coeficientes de morbidade, ou os dados apresentados como tais merecem tão pequena confiança que se tornam praticamente inúteis.

Para quase todas não dispomos de coeficientes de mortalidade fidedignos e para muitas, dada sua baixa letalidade, tais coeficientes nada dinham de importância que representam para a saúde pública. Da totalidade, não temos a menor idéia sobre os dias de doença, incapacidade e de acamamento resultantes. Nem tão pouco sobre o número de dias de hospitalização que exigiram. Nada sabemos sobre a assistência médica, particular ou não, que seus casos requereram. Não possuímos, assim, a mínima idéia sobre o desgaste orgânico e a perda econômica que representam e muito menos dispomos de qualquer meio para avaliar o sofrimento que acarretam.

Mesmo no que se refere aos simples coeficientes de prevalência de todo o extenso grupo de moléstias cuja transmissão se faz através dos excreta, possuímos dados seguros ape-

nas das enteroparasitoses, e êstes revelam sua larga disseminação. Se a informação de que dispomos neste particular é muitíssimo mais ampla e certa do que a referente às infecções provocadas por bactérias ou vírus, está longe, todavia, de ser completa.

A menor dificuldade de diagnóstico da grande maioria das parasitoses intestinais (se comparada àquela apresentada pelos métodos de reconhecimento das infecções entéricas, a bactérias ou a vírus), facilitou a realização dos numerosos inquéritos bem conduzidos, realizados em diferentes grupos de nossas populações, que trouxeram a caracterização nítida da extensão e intensidade alcançadas pela ocorrência das diferentes helmintíases e protozooses. Nem sempre, porém, distinguem a verdadeira incidência das parasitoses doenças, de estados que se qualificariam simplesmente como de portador. Portanto, êsses índices de prevalência das enteroparasitoses também sofrem restrição.

Apesar de tudo, os índices utilizáveis de que dispomos são suficientes para evidenciar um grande problema.

Característica das regiões atrasadas sanitariamente, os níveis elevados dos coeficientes das moléstias dêsse grupo traduzem simplesmente a situação de deficiência em que vive grande parte de nossa população.

Entre essas deficiências avultam, reconhecidamente, as do saneamento do meio físico e nestas, predominam as que são responsáveis por transmissão de agentes etiológicos eliminados pelas fezes.

Mesmo em nossas grandes cidades, as condições referentes ao abastecimento de águas e de alimentos e as relativas ao destino dos excreta continuam, para grande parte de seus ha

bitantes, tão más quanto há dezenas de anos. Na realidade, em muitos casos, essa situação tem se tornado pior, em consequên-
cia da aglomeração crescente da população, em zonas desprovi-
das de medidas elementares de saneamento.

Fatos dessa ordem são fácilmente verificáveis em São Paulo e o reflexo de tal condição se manifesta claramente nos nossos poucos dados epidemiológicos utilizáveis, relativos à incidência de moléstias do grupo em discussão.

Foi o que puderam verificar Ayroza Galvão, Moraes, Birkholz e Garcez Filho (218), em estudo, apresentado em 1956, sobre alguns elementos da estrutura epidemiológica da cidade de São Paulo, no que se refere a essas doenças. Nele discutiram algumas das deficiências de saneamento do meio físico, já mencionadas. Após exame das falhas dos dados de registro de morbidade e mortalidade das várias moléstias transmissíveis pelas fezes, apresentaram argumentos apontando o quociente de morbidade das febres tifóidicas como o melhor índice que se pode ter, dentre os dados de registro, do potencial de transmissão das infecções em apreço. Em seguida analisaram o comportamento desse coeficiente nos últimos anos, considerando todo o município ou seus vários distritos separadamente, e o fizeram apreciando sua variação de acôrdo com o estudo econômico-social.

Ao fim de seu estudo apresentaram os autores doze conclusões, dentre asquais serão citadas:

- 1- As moléstias infecciosas cujos agentes etiológicos eliminam-se pelas fezes constituem sério problema de saúde pública no município de São Paulo. Dentre elas, são as febres tifóides e para tifóides as que apresentam mais facilidade para estudos epidemiológicos baseados em dados de registro de órbitos

e de notificação de casos.

- 2 - O declínio muito grande da incidência e mortalidade das febres tifóidicas no município de São Paulo ainda não chegou a um limite satisfatório. Por isto, estas moléstias constituem problema de importância em Saúde Pública, embora de menor relevo do que em épocas passadas.
- 3- Os coeficientes de mortalidade nos últimos três anos (1951 - 1953) não se alteraram e os de morbidade subiram, mostrando que a transmissão deste grupo de moléstias não diminuiu, tudo sugerindo, mesmo, que tenha aumentado.
- 4- Os dados sobre febres tifóidicas servem para nos dar uma indicação do que ocorre com a transmissão das outras moléstias que se propagam através dos excreta, tais como as shigeloses, amebíases e disenterias por várias causas. É muito sugestivo disto o fato de terem aumentado em São Paulo os coeficientes de mortalidade destas infecções nos últimos cinco anos.
- 7- O fato dos bairros providos de rede de água em 100 por cento de sua área, tanto os de operários como os de pessoas mais abastadas, apresentarem coeficientes de morbidade que ainda se consideram altos, embora menores do que nos distritos desprovidos de rede de abastecimento, indica que uma vez eliminado

o fator da falta d'água de rêde pública, ainda restará um resíduo de casos que aparece - rão em consequência de outros fatores de transmissão. Estas questões precisam ser esclarecidas por meio de estudos de campo, entre outros sobressaindo-se os relativos à propagação de portadores, do papel que representam os manipuladores de alimento, da produção de moscas e da freqüência de focos de poluição por matéria fecal em terrenos baldios.

- 9 - O estudo preliminar dos dados disponíveis sobre as condições de saneamento de meio nos bairros da Capital Paulista desprovidos de rêde pública de abastecimento d'água e dos dados por nós colhidos, mostra que a situação nestes bairros continua a ser favorável à transmissão das moléstias propagadas através das excreta e sugere que estudos mais detalhados devem ser feitos em relação a cada um dos fatores de importância epidemiológica, como o de abastecimento individual de água, do destino dos excreta, do destino do lixo, produção de moscas, poluição de terrenos baldios, hortas e chácaras.

Puderam os autores mencionados, portanto, através dos coeficientes de mortalidade das febres tifóidicas, concluir da existência em São Paulo de problema de importância em Saúde Pública, no que se refere a este grupo de moléstias.

Pensamos que outro grupo de doenças também poderia

dar idéia bastante clara da extensa disseminação, em nosso meio, de agentes patogênicos eliminados pelas fezes. Trata-se das gastro-enterites infantis. Não possuímos dados de morbidade referentes a essas moléstias, porém, dada a gravidade que costumam assumir em regiões de grandes contingentes de população de nível econômico-social inferior, seus coeficientes de mortalidade exprimem bastante bem o problema que constituem.

É sabido que, de modo geral, a proporção de casos de gastro-enterites de origem desconhecida, é tanto menor quanto mais baixo for o padrão sanitário de uma população. É conhecida também, a predominância das bactérias do gênero *Shigella* na etiologia de tais doenças, em regiões de condições sanitárias deficientes.

Hardy e Watt (22), em trabalho publicado em 1938, décimo oitavo da série "Estudos das Doenças Diarrêicas Agudas", relataram ter isolado shigelas das fezes de 75 por cento das crianças mortas por doenças diarrêicas, no Novo México e Geórgia. Observando dados apresentados por êstes autores, pode-se notar a relação bastante estreita entre os coeficientes de mortalidade por doenças diarrêicas, registrados nos estados de Novo México e Geórgia, e os coeficientes de morbidade de casos de doenças diarrêicas agudas com cultura positiva (baseados em casos descobertos por seguimento intensivo de grupos selecionados da população); assim também, entre êsses coeficientes e as taxas de prevalência de portadores passivos de shigelas entre os indivíduos sadios, da população geral dos respectivos estados.

Hernacche, Surrace, Peluffo e Aleppo (23), publicaram, em 1943, seu estudo sobre a etiologia de 663 casos de

enterite em crianças, admitidas, de junho de 1936 à junho de 1942, em Hospitais de Montevideo. Pesquisando a presença de shigellas e salmonelas, concluíram que 38,9 por cento eram devidos às bactérias do primeiro gênero e 22,8 por cento, às do segundo.

Fuderam evidenciar que "a ocorrência dessas bactérias como agentes etiológicos da enterite infantil, em números absolutos, é inversamente proporcional à idade, prova de que a criança é mais suscetível à infecção por êsses microrganismos, do que os adultos; mas que se as porcentagens de tais infecções foram consideradas em relação à incidência total de enterite, é evidente que variam em proporção direta. No primeiro ano de vida, 57,5 por cento das enterites eram de origem conhecida; no segundo ano, 77,8 por cento, e do segundo ao décimo segundo ano, 94,4 por cento".

Os autores (224), em segundo estudo, sobre 172 casos de gastro-enterites infantis, internados de junho de 1942 a junho de 1947, atribuíram 33,7 por cento a Shigella e 41,9 por cento a Salmonella, enquanto de 1.690 casos classificados como portadores de diarreia simples, isolaram shigellas e salmonelas somente de 32 e 124 casos, respectivamente. Concluíram que, para as crianças de mais de 2 anos de idade, se podia dizer que o problema da etiologia de enterite estava praticamente resolvido, mas que para infantes de menos de 1 ano, 42 por cento das infecções, eram de origem desconhecida". Acrescentaram: "...acreditamos que não pode haver mais nem uma dúvida de que, pelo menos no Uruguai, as shigellas e salmonellas são as responsáveis pela maioria dos casos de diarreia infantil de verão e pela maioria das mortes...".

As investigações sobre as shigeloses, levadas a

efeito no Egito por Floyd e colaboradores, publicadas em 1954, 1955, 1956 e 1957, demonstraram também a altíssima prevalência de infecções por *Shigella* nas crianças de aldeias desprovidas de condições de saneamento.

Em estudo inicial de uma série sobre as doenças diarrêicas na América Central, Beck, Muñoz e Scrimshaw (219), chamaram a atenção sobre os elevados coeficientes de prevalência de *Shigella* nas crianças da Guatemala - onde os coeficientes de mortalidade por enterites são os mais elevados da América Central - e sobre a comparabilidade de tais coeficientes com os obtidos em áreas específicas dos Estados Unidos em períodos em que as infecções por *Shigella* eram a causa principal da mortalidade por enterites.

De todos êsses trabalhos, pode-se concluir que grande proporção dos casos de gastroenterites infantis são comprovadamente de origem infecciosa e tudo leva a crer que tal proporção, principalmente a porcentagem devida a shigelas e salmonelas, é maior justamente nos locais onde as gastroenterites alcançam mais altos coeficientes de mortalidade.

Tudo indica que os coeficientes de mortalidade por gastroenterite são conhecidos com exatidão bastante grande, tanto no município de São Paulo como na maior parte dos municípios do interior do estado. Poderiam êles, assim, suplementar a indicação dada pelos coeficientes de febre tifóide, sobre a disseminação, em nosso meio, das moléstias transmissíveis pelos excreta.

Obtivemos, por essa razão, o número de óbitos por gastro-enterite e colite e por diarréia do recém-nascido, ocorridos nos últimos anos, no município de São Paulo e no

QUADRO A

ÓBITOS POR GASTRO-ENTERITE E COLITE E POR DIARRÉIA DO RECÉM-NASCIDO, EM SÃO PAULO

Causas de morte (Nomenclatura Internacional- 1950/59)	Município de São Paulo							Interior do Estado de São Paulo						
	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1956	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1956
Gastro-enterite e colite (exceto colite ulcerosa) em idade de 4 semanas e mais (571):														
- Idade entre 4 semanas e 2 anos (571.0)	2.492	2.696	2.039	2.697	2.697	3.257	3.280	7.768	8.545	8.512	9.133	8.597	9.517	9.283
- Idade de 2 anos e mais (571.1)	216	176	142	206	206	201	261	1.429	1.189	988	1.122	1.152	1.194	1.239
Diarréia do recém-nascido (764)	203	252	227	271	245	305	369	572	627	698	722	721	783	835
Total	2.911	3.124	2.408	3.174	3.148	3.763	3.910	9.769	10.361	10.198	10.977	10.470	11.494	11.357
Tôdas as causas de morte (001/E999)	22.267	23.794	22.565	24.188	25.588	27.819	29.233	88.569	90.947	84.771	84.077	81.377	85.350	84.849

Fonte: S.22 - D.2 - DEESP

interior do Estado. São apresentados no Quadro A.

Comparando-os com os que ocorrem em outros países, podemos julgar melhor a nossa situação. Com essa finalidade, são apresentados no Quadro B os coeficientes específicos por idade, calculados através de dados publicados no Anuário Epidemiológico e Demográfico (1953) da Organização Mundial de Saúde ou fornecidos pelo Departamento de Estatística do Estado de São Paulo.

QUADRO B

Mortalidade por gastro-enterite e colite no Estado de São Paulo e em vários países, no ano de 1954

País	Nº de crianças na idade entre 4 semanas e 2 anos	Nº de óbitos entre 4 semanas e 2 anos de idade	Coeficiente por 100.000
Estados Unidos	3.253.460	4.242	58,2
Inglaterra	618.460	514	38,1
França	720.648	587	37,3
Itália	764.364	6.396	371,9
Suécia	70.633	32	17,5
Austrália	185.629	208	50,8
Estado de São Paulo	587.319	11.294	1.923,0

Ambos os quadros revelam um grande problema de saúde pública. Pelas razões que foram expostas, seus dados indicariam também a grande disseminação de agentes patogênicos intestinais entre nós.

FINALIDADE DÊSTE ESTUDO

Os altos coeficientes de morbidade das febres tifóidicas, assim como o elevadíssimo número de óbitos por gastroenterite e colite que ocorrem anualmente, quer no interior do Estado, quer no Município de São Paulo, traduzem a extensa transmissão das moléstias causadas por agentes etiológicos eliminados pelas fezes.

O fato, de mesmo os bairros da cidade de São Paulo providos de rede de água em 100 por cento de sua área apresentarem coeficientes de morbidade das febres tifóidicas ainda considerados altos, indica - como notado no estudo já referido () - a atuação, nessa cidade de outros fatores de transmissão.

Tais fatos decidiram o autor a iniciar série de investigações destinadas a procurar esclarecer o papel que as verduras consumidas crás poderiam exercer em tal situação.

O problema da transmissão de doenças parasitárias - a vírus, bactérias, protozoários ou helmintos - através de hortaliças, envolve inúmeros aspectos, muitos dos quais ainda não de todo conhecidos.

Êsses vegetais, como qualquer outro alimento, poderão ser contaminados no seu manuseio por portadores de agentes patogênicos, nas várias operações a que são submetidos até seu consumo.

Além dessa modalidade, podem ser contaminados por modos próprios e que são, muitas vezes, facilmente controláveis através de medidas de saneamento do meio. Êsse modo de contaminação pode ocorrer, durante seu cultivo, direta ou indiretamente.

O primeiro caso se dá através do emprêgo de excreta humanos ou animais como fertilizante, tanto quando são usados

in natura como quando aplicados após fermentação mal conduzida ou qualquer outro tratamento incompleto.

O segundo ocorre pela irrigação com esgotos, ou águas poluídas por esgotos, de origem humana ou provenientes de animal, e pela lavagem dos vegetais em água nessas condições. A lavagem contaminadora, mais frequentemente, se dá na própria fonte de produção, após a colheita e como preparo do produto para a distribuição.

Em várias regiões do mundo, densamente povoadas, o uso de fezes humanas como adubo, que são aquelas que representam o maior potencial de risco de saúde, tornou-se condição de sobrevivência de suas populações e tem sido utilizado desde tempos remotos. Na maioria dos países ocidentais, essa prática de adubação tem tido aplicação relativamente restrita e o maior perigo se encontra na irrigação e lavagem com águas poluídas, com frequência contaminadas por organismos patogênicos.

Em qualquer dos casos, estabelecem-se condições motivadoras de risco de saúde, do qual participam não só os consumidores dos vegetais, como também os horticultores e todas as pessoas que lidam com as hortaliças.

É conhecida a existência de hortas irrigadas com águas de regatos poluídos por esgotos domésticos, nos bairros periféricos da cidade. O próprio autor (220) teve ocasião de descrever e fotografar horta e regato nessas condições, em inquérito que realizou em 1939 sobre as condições sanitárias de três distritos da Capital.

Estudo da contaminação de hortaliças distribuídas em São Paulo, principalmente daquelas consumidas cruas, por bactérias de origem fecal, parecia assim perfeitamente justi

ficado. É notório que das hortaliças consumidas sem cocção, a mais frequentemente usada entre nós é a alface (Lactuca sativa). Resolvemos, por isso, emprender a realização de investigação bacteriológica de suas condições sanitárias.

A inexistência de método padronizado para o exame bacteriológico de hortaliças e mesmo de qualquer método de uso mais difundido levou-nos a investigar a aplicação, no exame de alface, de algumas das técnicas utilizadas na pesquisa de microrganismos de origem fecal na água.

Tendo as pesquisas realizadas revelado geralmente, a presença de grandes densidades das bactérias procuradas, fomos levados também a investigar o efeito de alguns métodos de tratamento, de aplicação doméstica, na redução do número de bactérias.

Os resultados das várias experiências são apresentados neste estudo. Pode êle ser dividido em duas partes.

Na primeira parte é feita a revisão de literatura sobre a presença de microrganismos patogênicos em hortaliças, assim como, de literatura referente a problemas correlatos, directa ou indirectamente, à questão.

Na segunda parte, são apresentados os resultados de nossas investigações sobre técnicas de determinação do número de microrganismos de origem fecal na alface e sobre a avaliação da grande contaminação dessa hortaliça em São Paulo.

P A R T I

SÓBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO SALMONELLA EM ESGOTOS

É de interesse rever algumas investigações acêrca da sobrevivência da Salmonella typhosa nos esgotos, pela relação que apresenta tal fato com a sobrevivência do bacilo na água e, também, devido à possibilidade dos próprios esgotos serem utilizados na irrigação de hortaliças. Além disso, dado seu valor fertilizante, o lodo obtido por vários tipos de tratamento de esgotos tem sido utilizado como adubo, e é de utilidade examinar também o problema da existência de patogênicos em tal lodo.

Courmont, Rochaix e Lanpin (28), em trabalho levado a efeito em 1921, invariavelmente puderam demonstrar a presença de germes do grupo tifóide-paratifóide nos efluentes de lodo ativado, após aeração de 6 horas.

Wolman (22), em 1924, demonstrou que a Salmonella typhosa podia sobreviver à digestão anaeróbica pelo lodo, até 7 dias.

Bruno e Sierps (19), em 1927, estudaram a resistência de patogênicos intestinais no esgoto, ao tratamento pelo lodo ativado. Em esgoto ao qual juntaram 450.000 bacilos de febre tifóide por ml, obtiveram redução de 96% após tratamento de 12 h. Reduções semelhantes foram observadas com bacilos paratifóidicos e disentéricos e com o vibrião colérico.

Gray (66), em 1929, isolou Salmonella paratyphi B de sete dentre vinte amostras dos esgotos de Edimburgo. O isolamento só foi bem sucedido no dia de colheita. Exames feitos 2 e 4 dias depois, foram todos negativos. Comentando este tra

balho de Gray, Suckling (66), refere os resultados como não usuais, citando o caso em que conseguiu repetidamente isolar Salmonella typhosa de uma mesma amostra de esgoto in natura, conservada no escuro, à temperatura ambiente (10-15°C), até o décimo quarto dia.

Pesch e Saverborn (154), no mesmo ano, relataram redução de 50% no número de Salmonella paratyphi B, após uma hora no lodo ativado, e nenhuma redução posterior até o segundo dia.

Stewart e Ghosal (185), ainda em 1929, determinaram a redução do número de bacilos coliformes e da febre tifóide em esgoto tratado pelo lodo ativado. As reduções encontradas foram as mesmas para ambos os germes e foram de: 60% após aeração de 1 hora, cerca de 90% após aeração de 2 e 3 h, cerca de 99% após 4 e 5 h e de 99,9% após 6 h. Depois de 24 horas de aeração relataram redução percentual de, aproximadamente, 100%. Com a Salmonella paratyphi A e o V. comma, relataram terem obtido resultados semelhantes.

Rochaix (18), em 1930, estudou o efeito da flora normal dos esgotos sobre as bactérias intestinais patogênicas. Verificou a sobrevivência de Salmonella Typhosa, S. paratyphi, S. schottmülleri, Vibrio comma e Pseudomonas aeruginosa em água de esgoto e em água destilada, ambas esterilizadas. Repetiu que usou todas as experiências, juntando à água de esgoto esterilizada, determinadas microrganismos saprófitas isolados dos mesmos esgotos. Na água destilada, a sobrevivência foi maior que na água de esgoto esterilizada. Nesta atingiu a 7 e a 20 vezes, respectivamente no caso da Salmonella typhosa e da Pseudomonas aeruginosa. Na água de esgoto esterilizada, à qual juntara culturas originárias dos esgotos, a sobrevivência má

xima observada para a Salmonella typhosa foi de 3 meses.

Wilson e Blair (209), em 1931, puderam obter isolamento da Salmonella paratyphi B e de Salmonella typhosa, de amostras de esgotos, conservados no laboratório, à temperatura ambiente, durante 3 e 5 semanas, respectivamente.

Ruchhoft (141), em 1934, realizou estudos sobre a longevidade do bacilo da febre tifóide no lodo ativado. Encontrou redução de 86% no número de Salmonella typhosa, após aeração de 5 horas e meia, no lodo ativado. A sobrevivência do bacilo no lodo, foi de cerca de 80 dias, à temperatura de 10 a 15° C, e de 13 a 14 dias, de 20 a 22° C. No lodo ativado, da estação de tratamento de esgotos de Chicago North Side, encontrou a relação de 1 Salmonella typhosa para 7.700 coliformes, o que o levou a recomendar o máximo cuidado no uso de lodo ativado úmido, como adubo para hortas.

Houkelekian e Schulhoff (78), em 1935, estudaram a sobrevivência de Salmonella typhosa em águas superficiais e em esgotos.

(156)
Rudelfs, Falk e Nagetzko assiam resumo o trabalho desses autores: " Concluíram que a mortalidade de Eberthella typhosa em águas poluídas e esgotos era alta, atingindo a 99% de 6 a 10 dias, e que era maior a 22° e 37°C do que a 2°. Em água de rio poluída e em esgotos encontraram, respectivamente, sobrevivência de 12 e de 17 dias, a 2° C; de 2 e 3 dias, a 22°C e de 1 dia, em ambos, a 37°C. Sob condições favoráveis de temperatura e em presença de suprimento nutritivo, a Eberthella typhosa podia multiplicar-se; mas a sobrevivência não era prolongada e o declínio subsequente era, proporcionalmente, maior. Quando pequenas quantidades de material orgânico, como fezes, urina, esgotos, caldo, ou material de meio de cultura levado com o inó

culo, foram juntadas a águas não poluídas, forneceram elementos nutritivos suficientes para a multiplicação da Salmonella typhosa aí introduzida.

Em águas poluídas, a sobrevivência foi mais curta do que nas não poluídas. A concorrência de outros bacilos pelo alimento e a predação por protozoários foram consideradas as causas prováveis desta sobrevivência menor.

Em condições de deficiência de nutrientes a Salmonella typhosa e a Escherichia coli não tiveram nenhuma ação recíproca. No entanto, a sobrevivência da Salmonella typhosa, em presença de material nutritivo, foi reduzida ao se juntar a Escherichia coli.

A destruição da Eberthella typhosa em esgoto parcialmente clorado, foi semelhante à da flora normal do esgoto. Somente 25% da demanda de cloro teve de ser satisfeita para se obter 99% de mortalidade de Eberthella typhosa após contacto de 10 minutos".

Tanner (193), em 1935, apresentou revisão da literatura sobre os aspectos sanitários da utilização do lodo de esgoto como fertilizante.

Green e Beard (67) publicaram, em 1938, os resultados de sua longa e importante série de investigações sobre a presença e sobrevivência de Salmonella typhosa nos esgotos.

Entre as suas conclusões, relataram que isolamentos de bacilo tifóidico, a partir de porções de 1 ml de esgoto in natura de Palo Alto, foram bem sucedidos em vários casos. Chamaram a atenção sobre o fato de que o isolamento de tais bacilos do esgoto de uma cidade de alto padrão de saneamento, onde não ocorrera nenhum surto de febre tifóide nos últimos 30 anos, reafirmava a necessidade de vigilância constan

te se se quisesse manter barreiras eficientes entre o material infeccioso e os hospedeiros naturais.

Confirmaram os achados de investigadores anteriores sobre a longevidade do bacilo tifóidico no esgoto, tendo demonstrado que ocorre um decréscimo rápido nos primeiros 3 ou 4 dias, depois dos quais os sobreviventes podem persistir por várias semanas. A influência da temperatura também foi notada, bem como por outros investigadores. Em temperatura inferior, o tempo de sobrevivência é mais longo.

Em condições simulando um tanque séptico, encontraram 2 a 3% dos bacilos da febre tifóide sobrevivendo por 4 dias, tanto no sobrenadante, como no conteúdo total misturado do tanque. Após período de 4 dias, havia menos sobreviventes no sobrenadante, se bem que ainda foram encontrados durante 27 dias em porções de 0,1 ml, tanto do lodo misturado e da espuma, como do sobrenadante.

Suas experiências em lodo ativado, indicaram que se pode esperar redução de 90 a 99% dos bacilos da febre tifóide, durante aeração de 6 horas e que, na maioria dos casos, somente 1 a 3 por cento sobrevivem. Uma experiência realizada com lodo ativado, suficientemente aquecido para destruir ou inativar protozoários e bactérias não esperuladas, indicaram que a atividade biológica, e não a aeração por si mesma, é responsável pela redução do número de Salmonella typhosa no lodo ativado. Um aumento dos bacilos da febre tifóide ocorreu durante 3 dias de aeração do lodo previamente aquecido. O testemunha revelou o decréscimo normalmente esperado em tempo igual.

Nos estudos relatados, um filtro biológico, operando intermitentemente a taxas efetivas de até 2.8 milhões de galões por acre, por dia, removeu 99,9% dos organismos tifóidicos do esgoto. Reduções de 96 a 99%, foram conseguidas a taxas de aplicação constante até de 6,6 m.g.a.d. e uma redução de

95%, a 12 m.g.a.d. Com ciclos alternados de aplicação e descanso, adicionaram por 1 ou 2 minutos, concentrações elevadas de bacilos de febre tifóide, e puderam demonstrar a passagem de apenas poucos organismos viáveis, através do leite filtrante.

Beard (7), no mesmo ano, em artigo sobre a sobrevivência do bacilo da febre tifóide na natureza, comentando essas e outras observações, verificadas em suas próprias investigações ou nas de outros pesquisadores, chamou a atenção para o fato de que não devem elas conduzir a sentido falso de segurança, afirmando: "Não estamos preocupados com a percentagem que morre, e sim com a pequena percentagem que sobrevive. Nosso objetivo não é tornar a água menos perigosa e sim torná-la segura. Não é nenhuma consolação para o paciente de febre tifóide, filosofar que a água que bebeu era 99.99% pura".

Stolkes, Jones e Miles (187), em 1945, observaram que a Salmonella schottmulleri podia ser isolada por 41 dias, a partir de 0,1g de lodo em dessecação, que recebera inoculação inicial de 25.000.000 de bacilos por ml. A Salmonella typhosa pôde ainda ser recuperada após 180 dias, quando a unidade atingia só a 14%, partindo-se da concentração inicial de 7.500.000 por ml de lodo.

Capítulo II

SOBREVIVÊNCIA DE BACILOS DO GÊNERO SALMONELLA NA ÁGUA

As condições naturais normais, fora do organismo humano, não são favoráveis aos bacilos das febres tifóide e paratifóides.

Encontram-se, portanto, escassamente distribuídos na natureza e não é provável estarem presentes senão em número relativamente pequeno na água, mesmo quando sujeita a poluição constante por esgotos. O espaço de tempo, durante o qual essas bactérias patogênicas podem sobreviver nas fezes, esgotos, solo e água constitui, assim, um ponto de grande importância.

Entretanto, impossível o estabelecimento de seu tempo exato de sobrevivência, porquanto pode ser influenciado por inúmeros fatores. Assim, dependerá, por exemplo, de onde foram lançadas essas bactérias no solo; na água ou nos esgotos; da presença de outras bactérias, fungos, protozoários, etc.; da temperatura; da presença de substâncias tóxicas; da exposição à luz solar; da quantidade de oxigênio disponível, etc.

De maneira geral, pode-se afirmar que esses organismos patogênicos desaparecem mais rapidamente na presença de outras bactérias e de formas superiores da vida microscópica, como protozoários e certas algas. Os raios ultra-violetas do sol, quando capazes de atingi-los, destroem-nos intensamente. Em temperatura baixa, sua sobrevivência aumenta extraordinariamente, principalmente pela diminuição da atividade de micróbios antagônicos.

Jordan, Russell e Zeit, em Chicago, 1904, foram os primeiros a estudar a longevidade do bacilo da febre tifóide na água, procurando realizar os estudos nas condições mais naturais possíveis.

Utilizaram câpsulas recém-isoladas, suspensas nas próprias águas nas quais desejavam verificar a longevidade da bactéria. Com essas suspensões enchiam pequenos sacos ou tubos de paredes permeáveis (de "Celoidin" ou de pergaminho vegetal), os quais eram mergulhados nas águas dos locais investigados. Esses estudos foram levados

a efeito nas águas do Lago Michigan e em local relativamente pouco poluído do Illinois River e, também, nas águas altamente poluídas do Chicago River e do "Drainage Canal". Observaram que o tempo de sobrevivência era inversamente proporcional ao grau de poluição da água, a grande maioria dos bacilos parecendo dentro de 3 a 4 dias. No canal, a sobrevivência da maioria seria só de 2 dias. Em experiências subsidiárias, feitas no laboratório, verificaram a sobrevivência dos bacilos de 5 a 25 dias, em água de torneira esterilizada e somente de 4 a 7 dias na mesma água não esterilizada.

Wheeler(206), em 1906, estudou a questão em condições muito diversas e chegou a conclusões diferentes. Procurou medir a viabilidade do bacilo da febre tifóide na água, em condições diferentes de luz e temperatura, usando cêpa de laboratório, suspensa em água destilada, água de torneira e de um poço poluído. O prazo máximo de sobrevivência observado foi de 79 dias, verificado na água do poço a 20°C, em ausência de luz. Nestas condições chegou mesmo a verificar aumento do número de bacilos durante os primeiros 7 dias. Em seguida, experiência feita para comprovar o fato surpreendente que acabava de constatar, observou aumento durante as 17 primeiros dias. A seguinte tabela resumiria seus resultados no que se refere à sobrevivência máxima encontrada.

Temperatura (°C)	Tempo máximo de sobrevivência (dias)		
	Água destilada	Água de torneira	Água de poço
10 - 12 (no escuro)	17	21	37
37 (no escuro)	15	17	17
20 (no escuro)	37	43	79
20 (no claro)	13	15	15

De acôrdo com estes resultados, a longevidade do bacilo tifóide seria maior em presença de poluição; no escuro, a temperatura de 20°C seria mais favorável que as de 10 a 12° ou de 37°; e, em tôdas as condições experimentadas, a ausência de luz seria benéfica ao bacilo.

Russell e Fuller (170), seguindo a técnica já utilizada por Jordan, Russell e Zeit, fizeram nova observação em 1906. N

Nas águas relativamente puras, de um lago (Mendota), a longevidade observada foi maior, 8 a 10 dias.

Em esgotos, foi somente de 3 a 5 dias.

Porém, se os bacilos eram suspensos em águas do lago e mergulhados, dentro dos mesmos recipientes permeáveis, em esgotos correntes, já evidenciaram sobrevida até de 10 a 14 dias. Assim, o contato direto com organismos dos esgotos seria mais prejudicial que o contato com os produtos solúveis encontrados nos mesmos esgotos. Poderia se tratar em parte, de ação predadora de organismos anêles existentes.

Whipple e Mayer (21), no mesmo ano, verificaram que a presença de oxigênio na água prolongava a sobrevida. Em água estéril de torneira, a 20°, sob a pressão de uma atmosfera de oxigênio, a longevidade foi de 50 dias; sob atmosfera de hidrogênio, somente de 4 a 8 dias. Lembra-ram ser esta, possivelmente, uma das causas da sobrevida curta do bacilo nos esgotos, relatada por outros investigadores.

Ruediger (16) observou, em 1911, que bacilos da febre tifóide e coliformes desapareciam 5 ou 6 vezes mais rapidamente da água de rio poluído no verão do que no inverno. Achou que este fato devia ser relacionado ao aumento, no verão, das bactérias saprófitas, protozoários e plantas microscópicas.

Frankland (52) mostrou, no mesmo ano, que os bacilos da febre tifóide sobreviviam mais prolongadamente em águas superficiais poluídas esterilizadas do que nas não esterilizadas. Nas primeiras, verificou sua sobrevida até 20 a 51 dias, e nas segundas, 9 a 13 dias.

Houston (85) realizou exaustivos estudos sobre a viabilidade da Salmonella typhosa em água de rios in natura (Tamisa, Lee, New River). Nas suas primeiras experiências, empregou cêpas já com algumas passagens em laboratório. O número de bacilos juntados às amostras d'água variava de 40 a 8.000.000 (média de 1.000.000) por ml e as garrafas da água contaminada eram conservadas no escuro, a 10- 21°C. Achou que para se obter destruição praticamente total dos bacilos (impossibilidade de seu isolamento a partir de 100 ml de água), requeria-se período de 5 a 9 semanas, dependendo o tempo do número inicial. Em todos os casos, havia, no fim da primeira semana, uma destruição de 99,99%.

Experiências semelhantes (1910) realizadas com bacilos não cultivados em laboratório, empregando, com esse fim, a urina rica de bacilos da febre tifóide de um portador, mostrou declínio igualmente rápido na

primeira semana e o resultado final foi obtido ao fim de 3 semanas. A ~~di~~ ferença entre a viabilidade dos bacilos cultivados e dos não cultivados foi confirmada em 1911, empregando a mesma cêpa (da urina de outro portador) antes e depois de seu cultivo em meios de laboratório.

Em 1911, Houston, investigou o efeito da temperatura sobre a viabilidade da Salmonella typhosa em água de rio. Inoculou garrafas de água de rio, com 100.000 bacilos por ml e conservou-as no escuro, a temperaturas entre 0°C e 37°C. Duas semanas foram suficientes para os organismos não mais serem demonstráveis em 1 ml da amostra conservada a 37°C, enquanto 4, 5 e 9 semanas foram necessárias para obter o mesmo resultado com as amostras guardadas a 18, 10 e 0°C, respectivamente.

Suckling (190) obteve resultados semelhantes, principalmente em águas poluídas. Comparando o comportamento da Salmonella paratyphi B com o da Salmonella typhosa, em iguais condições, não encontrou nenhuma diferença.

Repetindo as experiências, com ambas as bactérias, mas tomando água pura e juntando apenas 5 bacilos por ml, não notou decréscimo na primeira semana. Somente no fim de 4 semanas obteve resultados negativos no exame de 1 litro d'água.

Cohen(27), em 1922, investigou a resistência da Salmonella typhosa e da Escherichia coli a várias concentrações hidrogeniônicas. Verificou que a maior tolerância exibida pela primeira correspondia a pH entre 5.0 e 6.4. Aumento de acidez, a partir dessa zona, resultava em mortalidade rápida. Para a Escherichia coli a zona era mais ampla e seu centro se aproximava de pH neutro.

Scott e McClure (177), em 1924, investigaram o efeito de valores mais altos de pH. Concluíram que se podia estabelecer um valor limite ao redor de 9.5, como marcando a zona a partir da qual a destruição dos bacilos coliformes e da febre tifóide se acelera rapidamente.

Wibant e Moens (207), em estudo de 1927, verificaram que o desaparecimento da Salmonella typhosa da água de torneira e de piscina se dava em 7 a 10 dias, correspondendo ao aumento de certos protozoários predadores. Em água do subsolo, entretanto, a sobrevivência era de quatro semanas na presença dos mesmos protozoários e de apenas mais uns poucos dias na ausência dos mesmos.

Ballantyne (4), em 1930, investigou a sobrevivência de Salmonella typhosa, Escherichia coli, Mycobacterium tuberculosis e Streptococcus pyogenes em água destilada e em solução salina a 0,85%.

Encontrou sobrevida maior na primeira. A Salmonella typhosa sobreviveu 5 vezes mais à temperatura ambiente do que a 37°C. Sua conclusão geral foi de que a sobrevivência de bactérias como essas é favorecida por temperatura baixa, quantidades máximas de nutrientes, um mínimo, ou mesmo ausência, de cloreto de sódio, e alta concentração inicial dos microorganismos.

Kyriassides (11) estudou, em 1931, a sobrevivência de bacilos da febre tifóide e vibriões coléricos, inoculados em água de torneira não esterilizada, água do Rio Spree e água de poço. Verificou que após 4-6 dias não mais os encontrava na água do rio nem na de torneira, enquanto, na água de poço, isso acontecia somente após 13 a 16 dias. Após esterilização dessas águas, a sobrevida era maior, porém, era reduzida extraordinariamente a cerca de 2 dias, se juntasse protozoários.

Stever (12), em 1941, investigou a viabilidade de bacilos desintéricos em água de poço, na Polônia. Suas experiências foram levadas a efeito a 37°C, à temperatura ambiente e a -3°C. Os resultados foram variáveis. À temperatura ambiente, a sobrevida foi de vários dias, às vezes de mais de uma semana; a temperaturas baixas, foi muito mais longa.

Vibrião colérico na água

Houston examinou água in natura de rio (Tamisa, Lee e New) à qual juntou vibriões coléricos e conservou no laboratório, à temperatura de 7 a 18° C.

Nessas condições 99,9% das vibriões morreram numa semana. Após período de 3 semanas não conseguiu mais isolar o vibrião de 100 ml de água em nenhuma experiência. As contaminações iniciais foram muito intensas, variando de 70 mil a 13 milhões por ml de água. Em água mais pura é provável que a sobrevida fôsse mais longa.

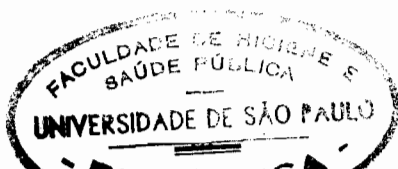
Greig (69) demonstrou que vibriões coléricos não cultivados, como no caso de bacilos de febre tifóide, morrem muito mais depressa do que os vibriões com passagens em meio de cultura, e, tam-

bém, que a temperatura exerce influência muito acentuada sobre a sua taxa de mortalidade.

Flu comparou, em 1921, a sobrevivência do vibrião colérico com a do bacilo da febre tifóide, em reservatórios e em tanques sépticos. Em ambos não conseguiu isolar o microrganismo do cólera 2 a 5 dias mais tarde, enquanto a Salmonella typhosa permaneceu viva 7 a 8 dias. Nos tanques sépticos, a sobrevida foi menor de que nos reservatórios.

Courmont, Rochaix e Lanpin (28), no mesmo ano, verificaram que o vibrião colérico não sobrevivia no tratamento de esgotos pelo lodo inativado, com aeração de 6 horas, enquanto bacilos da febre tifóide foram isolados do efluente após tratamento semelhante.

Lahiri, Das e Malik estudaram a viabilidade do Vibrio comma em águas de torneira, de fonte, de rio e de reservatórios, em Calcutá. Das águas naturais só conseguiram isolar o vibrião 1 a 72 horas mais tarde, enquanto em água esterilizada sua sobrevida chegou a 18 dias.



Capítulo III

SOBREVIVENCIA DE BACILOS DO GENERO SALMONELLA NO SOLO.

A investigação mais antiga sobre o problema da longevidade da *Salmonella typhosa* no solo parece ser a de Grancher e Deschamps (65), realizada em 1889. Relataram êsses pesquisadores terem reisolado bacilos da febre tifóide de terra, contida em cilindros de vidro, 5 meses após serem aí depositados. O processo de identificação adotado pelos autores, tem de ser, atualmente, julgado muito impreciso e seus resultados, questionáveis.

Outros investigadores procuraram conhecer a sobrevivência do bacilo em fezes humanas ou animais. Assim, Gärtner (59), em 1898, misturando os bacilos com estrume de vaca e de cavalo, encontrou-os vivos somente até o 7º dia. Verificou que a destruição dos bacilos se dava muito rapidamente e que era maior em temperaturas mais elevadas. Conseguiu isolá-lo de material colhido de fossas negras, somente até o segundo ou terceiro dia; de fezes, porém, até 2 a 3 meses mais tarde.

Entre outras da mesma época, Karlinski (94) procurou averiguar a sobrevivência do bacilo em fezes humanas. Em material colhido de fossas negras, conseguiu isolá-lo somente até o segundo ou terceiro dia; de fezes, porém, até 2 a 3 meses mais tarde.

Em outro trabalho, apresentado em 1891, Karlinski (95), verificou o período de sobrevivência do bacilo depositado no solo e encontrou o máximo de 3 meses; porém, ao invés de em cultura pura, ele o semeava no solo em mistura com fezes, sua sobrevivência era muito menor, o que o autor atribuiu à luta pela vida com as outras bactérias fecais. Verificou também que em profundidade morria mais vagorosamente do que à superfície, devido à ausência de luz e ao aumento de umidade. Em órgãos de cadáveres, mortos de febre tifóide, enterrados e já putrefeitos, encontrou o bacilo ainda vivo depois de 3 meses.

Uffelmann (198), em 1892, encontrou o bacilo ainda vivo,

apesar da dessecação, após 21 dias em terra de jardim, 82 dias em areia, 96 dias em poeira de rua e depois de 30 dias, em lixo.

Martin (125), estudou a resistência do bacilo em vários tipos de solo e procurou determinar também a possibilidade de seu espalhamento a partir do ponto de inoculação. De amostras de solo esterilizado, mantidas sempre úmidas, conseguiu isolar o bacilo tifóidico até 465 dias depois. De amostras da mesma espécie de solo, não esterilizado, conseguiu isolar o bacilo somente até 50 dias mais tarde. Rudolfs, Falk e Ragoskie (167), comentando este trabalho, chamaram a atenção sobre o fato de haver Martin juntado ao solo culturas em caldo, o que introduzia nutrientes estranhos ao solo e poderia explicar a longa sobrevivência observada.

Rulmann (18), em 1901, trabalhou com amostras de solo à temperatura ambiente e luz difusa e pôde isolar o bacilo da febre tifóide de solo esterilizado, ao qual o havia adicionado em cultura em caldo, 9 e 13 meses depois. Depois de 5 meses, o isolamento só foi possível com a inoculação de 25 a 30g de solo. Em solo não esterilizado, o isolamento só foi conseguido até 100 dias depois.

Este autor, assim como o pesquisador inglês precedente, empregou na identificação, além dos processos bioquímicos usuais, a prova de aglutinação, em título elevado, com soro anti-tifóidico.

Galvagno e Calderini (56), puderam demonstrar a sobrevivência da Salmonella typhosa em fossa negra, até 100 dias depois de aí lançada. Fezes contaminadas, após 10 dias na fossa, foram espalhadas sobre o solo ou misturadas a êle, abaixo da superfície. Puderam isolar o bacilo 20 dias mais tarde, no primeiro caso e 40 dias depois, no segundo.

Firth e Horrocks (46) em 1902, puderam determinar, entre outros pontos de interesse, que cêpas de laboratório e cêpas isoladas recentemente sobreviveram, em solo não esterilizado, 55 e 32 dias, respectivamente. As conclusões de seu importante estudo foram:

- 1) Não foi encontrada nenhuma evidência de que a Salmonella typhosa, colocada no solo, pudesse multiplicar-se, quer para cima, quer para baixo ou lateral

mente.

- 2) A Salmonella pode ser levada pelas águas, pelo menos a 45 cm de profundidade, mesmo quando o solo fôr muito denso e não apresentar nenhuma fenda.
- 3) O bacilo da febre tifóide é capaz de assumir uma existência vegetativa nos solos comuns e em solo poluído por esgotos e nelos sobreviver por períodos variáveis, que podem atingir até 74 dias.
- 4) A presença ou ausência de material orgânico nutritivo no solo, parece ser fator em grande parte negligenciável, uma vez que a Salmonella typhosa pode sobreviver indiferentemente bem, quer o solo seja poluído com matéria orgânica, quer se trate de solo virgem, e quer receba o solo, esgotos diluídos ou apenas água de chuva.
- 5) O excesso ou grande deficiência de umidade no solo parece ser o fator dominante que afeta a probabilidade de maior sobrevivência do bacilo, ou, pelo menos, sua possibilidade de recuperação.
- 6) De areia fina, deixada secar naturalmente, a Salmonella typhosa pode ser recuperada no 25º dia após a inoculação.
- 7) De areia fina, conservada molhada com água de chuva ou esgoto diluído, o bacilo tifóidico não pode ser recuperado depois do 12º dia após a inoculação; esta incapacidade de recuperação dos organismos, é devida, provavelmente, não tanto à sua morte como ao fato dêles serem carreados para as camadas mais profundas pelo líquido adicionado.
- 8) Em turfa, a Salmonella typhosa parece morrer rapidamente, uma vez que o bacilo não pôde ser recuperado após o 13º dia; mas este solo é tão poroso que é muito possível que os microrganismos tenham sido levados para as porções mais profundas e, conseqüentemente, não po-

diam ser recuperados do local da inoculação.

- 9) De solo comum, conservado úmido por adições ocasionais de água de chuva, o bacilo pode ser recuperado até o 67º dia.
- 10) De solo semelhante, conservado úmido por adições ocasionais de esgoto in natura diluído, a Salmonella typhosa é recuperável até o 35º dia.
- 11) Em solo semelhante, conservado úmido por adições ocasionais de esgoto diluído esterilizado, a Salmonella é recuperável até o 74º dia.
- 12) Em solo semelhante, após chuva forte, o bacilo da febre tifóide desaparece imediatamente das camadas superficiais.
- 13) De solo semelhante, deixado, após a inoculação, secar ao ponto de facilmente poder ser levantado como poeira pela movimentação do ar, a Salmonella Typhosa pode ser transportada por meio dos ventos e correntes aéreas.
- 14) Em solo poluído por esgotos, obtido de local sob um cano rompido, o bacilo tifóidico pode sobreviver até o 65º dia.
- 15) A Salmonella typhosa é capaz de sobreviver em solo superficial, à exposição de 122 horas de luz solar direta, estendendo-se por um período de 22 dias consecutivos. Que de um pedaço de sarja contaminada, o bacilo pode ser recuperado após o pano ter sido exposto a 50 h de insolação direta, por um período de 10 dias.

Sedgwick e Winslow (17), ainda em 1902, referem mortalidade de mais de 99% dos bacilos tifóidicos depositados em solo seco, em 2 semanas e sobrevivência mais longa em solo úmido.

Levy e Kayser (117), em 1903, observaram a sobrevivência do bacilo após 5 meses em fossa estanque e por mais 15 dias após terem sido as fezes da mesma fossa lançadas ao solo. Suas experiências foram realizadas nos meses frios do inverno.

Creel (29), em 1912, contaminou o solo preparado para o plan

tio de alfaces, com emulsão de fezes, à qual misturara suspensão de Salmonella typhosa em água esterilizada. A suspensão fôra preparada a partir de um tubo de agar inclinado e o máximo cuidado foi tomado para nela não entrar material nutritivo. O local, durante os primeiros 23 dias, recebeu insolação de 138 horas e somente 2,6 cm de chuva. Não foi regado nenhuma vez e, apesar de dessecação relativa, pôde ser demonstrada a presença de bacilos da febre tifóide no solo até o 35º dia.

Melick (127), em 1917, verificou que a longevidade do bacilo tifóidico nos solos era sujeita a grande variação, dependendo de vários fatores, como tipo de solo, quantidade de matéria orgânica existente, insolação, idade da cêpa, etc. Em experiências realizadas em condições iguais às de estufa, cêpas de inúmeras passagens em meios de cultura puderam ser isoladas de terra de jardim, que previamente recebera pequena quantidade de esterco até 74 dias depois, e de solo arenoso normal, só até o 53º dia.

Em experiências levadas a efeito ao ar livre, em terra de jardim, que recebera pequena quantidade de esterco, contaminada com fezes de doente de febre tifóide mais culturas mixtas feitas a partir destas mesmas fezes, o bacilo só pôde ser isolado até 41 dias depois. Cêpas recém isoladas, em terreno arenoso, ao ar livre, sobreviveram somente até o 29º dia. A quantidade de terra empregada por Melick no isolamento do bacilo foi sempre de apenas um grama.

Kligler (100), publicou, em 1921, os resultados da série de experiências realizadas a fim de determinar o perigo da poluição do solo relativamente à possibilidade de disseminação das infecções intestinais. Concluiu que, em geral, as bactérias causadoras da febre tifóide e disenteria sucumbem rapidamente na natureza. Verificou que a sobrevivência desses microrganismos era maior no solo do que em material altamente poluído. Segundo citado por Rudolfs, Falk e Ragotzkie (167), êle achou que solos úmidos, ligeiramente alcalinos, eram muito favoráveis à sobrevivência da Salmonella typhosa, a qual podia se estender até a 30 dias; porém em solo sêco era somente de 20 dias e em solo ácido, de apenas 10 dias; observou também que as bactérias

do gênero Proteus e a Pseudomona fluorescens, organismos freqüentemente encontrados no solo, exercem ação antagônica sobre a Salmonella typhosa, assim como sobre a Shigella dysenteriae. Beard (8), reconhecendo a série de experiências de Kligler como talvez a melhor organizada e mais exaustiva de todas as levadas a efeito até então, julgou-as, entretanto, efetuada sob condições controladas que não reproduziam inteiramente as condições naturais.

Beard, Carlson e Chambers (9), em 1937, e Beard (7), em 1938 e em 1940, estudaram a sobrevivência do bacilo da febre tifóide no solo. Foram confirmadas as conclusões de outros investigadores anteriores, de que o mais importante fator aparente, capaz de influenciar a sobrevivência da Salmonella typhosa no solo é a umidade, a qual está relacionada diretamente à quantidade de chuva, capacidade do solo de reter umidade, e à temperatura. Provavelmente 50% dos bacilos morrem, em geral, nas primeiras 24 horas. A sobrevivência dos restantes pode se estender por meses, dependendo das condições acima. O efeito do sol é grande, porém, só se exerce à superfície. No solo natural, a sobrevivência é maior que no solo poluído por esgotos. A morte ocorre mais rapidamente no solo impregnado com suspensão fecal do que com suspensão preparada em solução salina. O pH do solo pode afetar adversamente os bacilos, porquanto é tanto mais prejudicial quanto mais ácido, porém, na amplitude de variação normalmente encontrada, deve exercer pequeno efeito. A máxima sobrevivência verificada por Beard ocorreu na estação chuvosa, em grada. O número inicial de Salmonella typhosa por grama de solo era de 16 milhões. Após 7 dias, se reduzira a 3.500.000. Ao fim de 7 semanas, ainda era de 95.

Alguns dos dados principais de Beard foram resumidos por Rudolfs, Falk e Ragotzkie (15) em tabela que, por sua concisão, é reproduzida em seguida.

S O L O	Porcentagem de morte nas primeiras 24 horas		Dias de sobrevivência	
	Estação chuvosa	Estação sêca	Estação chuvosa	Estação sêca
Argila	25	45	42	21
turfa argilosa	30	50	42	28
greda	28	45	49	21
areia	70	95	8	4
turfa	99,99	-	1	2

Mallmann e Litsky (123), em 1951, num estudo sobre a sobrevivência de algumas bactérias intestinais em vários tipos de solo, verificaram também o decréscimo do número de Salmonella typhosa. Seus resultados foram resumidos em quadro, que é transcrito em seguida.

NMP médio de bacilos tifóidicos, expresso em logaritmo por 100 g de solo seco, em vários tipos de solos que receberam volume igual de esgotos in natura e igual quantidade de uma suspensão de S. typhosa.

Dias após a semeadura	Areia de Oshtemo	Greda arenosa de Miami	Greda argilo- sa de Brooks- ton	" Muck "
0	6,758	6,715	7,117	7,369
5	0	2,593	1,336	5,327
12	0	0	1,544	4,706
19	0	0	0	0
26	0	0	0	0
33	0	0	0	0
40	0	0	0	0

(159)
Rabinowitz, em 1954, verificou a sobrevivência da Salmonel-

la tennessee em terra-roxa de Israel. Em terreno irrigado uma única vez com esgotos, notou redução inicial muito rápida do número dos bacilos e seu desaparecimento total da superfície no 46º dia, e de camadas inferiores, no 70º dia. No verão, adicionou a salmonela a esgotos brutos, conservados em tanques abertos, usados comumente em Israel, para a irrigação. Parte dos esgotos foi aplicada sobre terre no não cultivado. Em sua superfície a salmonela não mais foi encontrada no 15º dia. No tanque, a salmonela sobreviveu até o 22º dia. Em solo, usado no cultivo de girassol, irrigado com os esgotos, o bacilo permaneceu vivo por 23 dias.

Dêsses estudos sobre a viabilidade da Salmonella typhosa nos solos, seleccionados dentre os mais criteriosos e mais conhecidos de suas respectivas épocas, pode-se verificar muito bem a longa sobrevivência, às vèzes surpreendentemente longa, que essa bactéria pode apresentar nessas condições. No entanto os resultados são muito variáveis, diferindo segundo as condições experimentais de cada investigador. Em circunstâncias inteiramente artificiais, como em solo esterilizado, ou em solo úmido congelado, o bacilo pode apresentar longevidade até de 1 ano ou, mesmo, de 2 anos. Em condições bem próximas das naturais, a viabilidade, de maneira geral, seria de menos de 100 dias, e está sujeita a grande número de fatores. Dentre êles, teriam maior influência o número inicial dos microrganismos, o teor de umidade do solo, dependente por sua vez da quantidade de chuva caída sobre êle e de sua capacidade retentora de umidade, sua temperatura, quantidade de matéria orgânica, pH, insolação a que está submetido (provavelmente atuando muito mais pelo aquecimento e secagem do solo) e presença de microrganismos antagônicos.

Quanto maior o número inicial de bacilos, o grau de umidade do solo e sua quantidade de matéria orgânica, mais prolongado será o período de sobrevivência.

A temperatura e a insolação agem em sentido inverso aos anteriores. Quanto ao pH, existe, naturalmente, uma zona ótima, e qualquer afastamento dela é desvantajoso ao bacilo, parecendo ser ainda a zona ácida mais prejudicial. A ação antagônica de outros mi

cróbios não está esclarecida. Entretanto, a maior sobrevida, demonstrada nos casos em que a inoculação foi feita em solo esterilizado, evidencia a existência de tal fator.

Capítulo IV

SOBREVIVÊNCIA DE BACIOS DO GÊNERO SALMONELLA EM VEGETAIS

Wurtz e Bourges (214), em 1901, demonstraram que vegetais poderiam ser contaminados através do solo inoculado com bactérias patogênicas intestinais. De verduras cultivadas em terrenos, onde haviam derramado suspensão de Salmonella typhosa, conseguiram isolar o bacilo, até três semanas após a contaminação.

Kozyn (107), em 1907, examinou vegetais cultivados nos arredores de Moscou. Embora evidenciassem a presença de grande número de bacilos intestinais, dêles não pode ser isolado o bacilo de febre tifóide. Não encontrou também bactérias no interior dos vegetais. Remiger e Nouri (160), em 1909, em Constantinopla, também investigaram a questão da possibilidade de penetração nos vegetais de bactérias patogênicas para o homem. Trabalhando em várias condições, com vegetais cultivados quer em terra quer em soluções, altamente contaminadas, não conseguiram verificar a presença das bactérias (vibrião cólerico e bacilo tifóidico) no interior dos vegetais nem uma só vez,

Numerosas outras experiências, feitas a partir da parte central de várias hortaliças, colhidas das hortas dos arredores de cidades, nas quais a utilização agrícola das águas de esgôto se fazia em condições descritas como deploráveis, também foram tôdas negativas. Concluíram que o perigo de contaminação só podia existir no exterior dos vegetais.

Creel (29), em 1912, em trabalho já mencionado, realizou interessantes estudos sôbre a contaminação externa de vegetais, cultivados em solo contaminado com Salmonella typhosa.

Suas primeiras experiências, legadas a efeito durante o inverno, foram realizadas em condições de estufa. No interior do laboratório, usou recipientes de vidro, cheios de terra, regados cada dois ou três dias. Depois de plantar as sementes, de rabanete e alface, regou a superfície da terra no dia seguinte com emulsão fecal misturada com cultura de 24 horas, em agar inclinado, de bacilo da

febre tifóide. A cultura foi removida com água esterilizada, de modo a levar o mínimo possível de nutrientes estranhos ao solo. A terra foi, pois, contaminada após a semeadura e antes do aparecimento das plantas.

Dadas as más condições ambientes, principalmente quanto à insolação, a qual foi somente de cerca de 30 horas, as plantas não atingiram desenvolvimento total. Após terem surgido acima da superfície realizou seu exame cada dois dias. As partes das plantas selecionadas para exame foram as fôlhas e hastes, cortadas bem acima do solo, de modo a evitar que as raízes, com partículas aderentes de terra, interferissem no resultado. O processo empregado no isolamento de Salmonella typhosa consistiu em esfregar diretamente as fôlhas e hastes sobre as placas de cultura, ou lavá-las com pequena quantidade de caldo, que era também inculado em placas. Colônias suspeitas eram submetidas a provas bioquímicas, de motilidade e aglutinação com sêro anti-tifóidico, e somente foram tomados em consideração os resultados das cêpas que demonstraram aglutinação em títulos elevados.

Dêste modo, Creel conseguiu demonstrar a presença de Salmonella typhosa nas fôlhas dos vegetais, até o 25º dia após a contaminação do solo.

Em segunda experiência, realizada em Abril e Maio, os vegetais foram plantados em canteiro ao ar livre, sujeito a insolação moderada. A técnica do plantio e da contaminação do terreno foi igual à precedente, assim como o método utilizado nos exames, que foram realizados de 3 em 3 dias. Desta vez, as plantas atingiram completo desenvolvimento. O isolamento do bacilo da febre tifóide das fôlhas e hastes foi conseguido até o 31º dia. Durante êsse período, o terreno esteve exposto a 138 horas de insolação e houve 4 dias de chuvas moderadas e 4 dias de precipitação leve. Creel empregou 6 a 10 placas de meio de Endo em cada exame, das quais 30 a 40 colônias suspeitas foram pescadas, tendo sido a grande maioria negativa. O autor chama a atenção para o fato de que a quantidade de chuva durante os 31 dias foi de apenas 2,6 cm e de que o canteiro não foi regado uma única vez o que produziu dessecação bastante acentuada. Sendo a dessecação um

dos fatores que mais afeta a sobrevivência do bacilo da febre tifóide as condições desta experiência foram consideradas mais severas do que as usuais na maioria das hortas, onde a irrigação dos vegetais assegura ambiente mais propício ao bacilo.

Em terceira experiência, Creel empregou ainda os mesmos métodos. Apenas, o local escolhido foi diferente por se achar exposto a insolação durante todo o dia. O isolamento só foi conseguido até o 10º dia tendo havido uma exposição total à insolação de 84 horas. Nada é referido sobre a quantidade de chuva.

Creel ainda procurou verificar o grau de aderência dos microrganismos às plantas, de maneira, segundo ele diz, a dar idéia sobre até que ponto se poderia considerar a chuva como capaz de libertar os vegetais em crescimento dos microrganismos infecciosos, retidos pelas folhas. Tomou uma folha de alface de um canteiro contaminado e submeteu-a à lavagem. A folha foi colocada em um frasco contendo água esterilizada e limpada perfeitamente, por meio de uma pipeta e agulha de platina. Esta operação foi repetida, passando a folha através de duas outras lavagens. Após a última lavagem, a folha, quase macerada, foi esfregada numa placa de meio de cultura e todas as três águas de lavagem foram, também, passadas em placas. As placas inoculadas com a água da primeira lavagem e com a folha deram resultados positivos.

Creel concluiu de seus estudos que as plantas cultivadas em solo contaminado podem reter sobre as folhas e hastes, a medida que crescem através do solo, os microrganismos nele existentes; que as chuvas não libertarão os vegetais desses microrganismos e que, mesmo em condições adversas à Salmonella typhosa, a contaminação do vegetal poderá persistir pelo menos durante 31 dias, prazo suficientemente longo para algumas espécies de alface e rabanete alcançarem desenvolvimento completo.

Poder-se-á observar que os bacilos, isolados por Creel das folhas aparentemente livres de partículas visíveis de terra, tanto poderiam ser provenientes de sua aderência ao vegetal durante o crescimento deste através do solo, como de partículas de terra respingadas sobre as folhas por ocasião das chuvas.

Em 1917, Melick (127) reinvestigou o mesmo problema sob con-

dições mais estritas, submetendo os vegetais, antes do exame, a lavagem em água corrente por 2 a 3 minutos, durante os quais eram os vegetais esfregados com as mãos protegidas por luvas de borracha. No mais, suas investigações foram iguais às de Creel, apenas tendo Melick o cuidado de proteger os vasos ou canteiros da experiência com telas, para afastar a possível contaminação através de insetos.

A técnica bacteriológica empregada por Melick foi cuidadosa e a identificação dos bacilos tifóidicos incluía provas de aglutinação com sêro anti-tifóidico, diluído a 1:1000. Em cada experiência foram usadas 30 a 50 placas de meio de Endo e um número igual de colônias suspeitas eram transferidas primariamente ao meio de Russell.

Melick realizou três experiências no interior do laboratório, uma com alfaces e as outras com rabanetes. Na primeira, contaminou o solo 3 dias após a semeadura, com suspensão de uma cêpa antiga de Salmonella typhosa. Conseguiu isolar o bacilo das fôlhas do vegetal até 18 dias após a contaminação. Nas experiências realizadas com rabanetes, foi empregada essa mesma cêpa antiga e uma cêpa isolada recentemente. No primeiro caso isolou o bacilo das raízes e hastes lavadas, até o 53º dia após a contaminação, e no segundo, até 35 dias depois.

Nas experiências realizadas ao ar livre, empregou fezes na contaminação dos canteiros, que mediam 1,2 por 1,8m. Após o surgimento das plantas acima da superfície do solo, foram examinadas a intervalos de 7 a 10 dias. Na primeira destas experiências, no 4º dia após a semeadura das sementes, o solo recebeu irrigação de 6 litros de uma diluição de fezes frescas, de doente de febre tifóide, misturada ao crescimento havido em três frascos de agar, semeados com 1 ml de emulsão das mesmas fezes e de urina. Não mais foi regado, exceto por precipitação natural. Os vegetais removidos para exame, permaneceram 2 dias no laboratório antes de o mesmo ser efetuado.

Das fôlhas e hastes lavadas de alface, foi isolado o bacilo tifóidico ainda no exame realizado no 21º dia após a contaminação.

ção do solo, e das raízes e hastas de rabanetes, igualmente lavados, o último isolamento do bacilo se deu no exame feito 41 dias depois. As alfaces, durante esse período, haviam sido expostas a 139 horas de insolação, a precipitação total de 8,8 cm e a umidade relativa média de 74%. Durante o período entre a contaminação do solo e o último exame positivo dos rabanetes, houve 276 horas de insolação e 15,8 cm de chuva.

Em segunda experiência, sementes de rabanete foram plantadas em canteiro irrigado 4 dias antes com 6 litros de emulsão a 1:6, de fezes de doente de febre tifóide. Os rabanetes eram colhidos e conservados no laboratório 2 dias antes de cada exame.

O último isolamento do bacilo a partir das raízes e hastas bem lavadas, deu-se 28 dias depois da contaminação do solo, tendo havido nesse período 211 horas de insolação e 10,4 cm de chuva.

Em terceira experiência, Melick contaminou o solo no mesmo dia em que semecou sementes de rabanetes. Os vegetais foram colhidos 3 dias antes de cada exame. O último exame positivo ocorreu 35 dias depois da sementeira e contaminação. Nesse período tinha havido 207 horas de insolação e 14,4 cm de chuva.

O autor chamou a atenção para o fato de que, aos 20-25 dias após a sementeira, os vegetais tinham igual desenvolvimento aos encontrados nos mercados.

Diante dos resultados obtidos, procurou Melick indagar da possibilidade da Salmonella typhosa penetrar no vegetal. Tomou rabanetes parcialmente crescidos em terreno não contaminado, e, para aumentar a possibilidade de penetração, esmagou as extremidades das raízes. Replantou-os e cobriu toda a parte de cima do vaso com papel grosso parafinado, perfeitamente adaptado à borda. Fez orifícios no papel para dar passagem às hastas, as quais, no ponto de passagem, foram cuidadosamente revestidas com algodão. Assim, a única passagem aparentemente possível a bactérias provenientes do vaso, tinha de ser através das próprias hastas. Contaminou então a terra do vaso,

através de tubo de vidro, logo abaixo do papel parafinado. Cada 2 a 3 dias, examinou as fôlhas e hastes superiores pela mesma técnica utilizada anteriormente, porém não logrou isolar o bacilo nem uma só vez. Como prova ulterior, tomou rabanetes de canteiro contaminado, flambou toda sua superfície, cortou-os em metades e esfregou as superfícies seccionadas sôbre placas de meio de cultura. Depois, macerou as metades dos rabanetes em solução salina e inoculou o material obtido em outras placas. Em nenhum caso conseguiu demonstrar a presença do bacilo.

Melick chamou a atenção para a facilidade de isolamento do bacilo no começo da experiência, e para a extrema dificuldade com que isso era alcançado no final do período, quando o número de microrganismos era pequeno, o que sugeria a possibilidade natural de ainda haver bacilos vivos mesmo quando não mais os conseguia revelar. Por essa razão, achou que vegetais cultivados em solo contaminado, deveriam ser considerados perigosos pelo mesmo tempo que os bacilos fossem capazes de sobreviver nesse mesmo meio.

Mills, Bartlett e Kessel (135), em 1925, realizaram importante estudo, cujas conclusões foram:

- 1) Frutas e hortaliças normais, não machucadas, não contêm bactérias vivas dentro de seus tecidos.
- 2) Substâncias como carvão, finamente divididas em partículas correspondendo em tamanho a bactérias, cistos de protozoários e ovos de helmintos, não penetram pela extremidade seccionada do caule, em extensão apreciável.
- 3) Bactérias não penetram através da superfície íntegra de frutas ou verduras, conservadas nas condições usuais.
- 4) Bactérias, patogênicas ao homem, podem ganhar entrada em frutas ou verduras, através de porções traumatizadas e deterioradas, onde podem se espalhar por extensão muito limitada, e podem permane

- cer vivas por 7 a 42 dias. Podem contaminar a ex tremidade cortada do caule e permanecerem viáveis por tempo semelhante. É, portanto, aconselhável re mover tais porções antes de tentar a esterilização.
- 5) Bactérias patogênicas podem persistir na superfí cie de frutas e verduras, conservadas em condi - ções de umidade, por 15 dias ou mais.
 - 6) A cloração, em todos os casos, libertou a superfí cie dos vegetais de bactérias patogênicas, mas não foi eficaz contra cistos ou ovos de vermes.
 - 7) O álcool é ineficaz contra cistos de protozoários e ovos de helmintos, quando aplicado em período suficientemente curto para torná-lo valioso como agente desinfetante.
 - 8) Permanganato de potássio, nas concentrações usadas comumente, não é agente desinfetante eficaz contra ovos de helmintos e cistos de protozoários.
 - 9) Inflamando-se álcool na superfície de frutas e verduras, ou derramando-se água fervente sôbre elas, não se destroem todos os organismos pa togênicos, quer bactérias, cistos ou ovos. O calor não penetra suficientemente em tôdas as fissuras.
 - 10) A imersão de frutas e verduras por 10 segundos em água fervente ou em água que permaneça acima de 80° C durante a imersão, é o único método descoberto até agora, capaz de matar uniformemente tô das as bactérias, cistos de protozoários e ovos de helmintos que possam estar contaminando tais produtos, tornando-os seguros para o consumo humano sem cocção.

Considerou os vegetais de raízes comestíveis, como os rabanetes, mais passíveis de transmitir infecções, devido ao contacto íntimo das raízes com o solo, no qual os bacilos se encontram protegidos contra a insolação e dessecação. Lembrou ainda que a lavagem, muito mais cuidadosa que a normal, que empregara, não havia libertado o vegetal de contaminação.

Susuki (191), em 1930, comprovou o alto poder bactericida do cloro para bactérias patogênicas intestinais. Nas condições de sua experiência, solução com menos de 3 p.p.m. de cloro matou todos os bacilos da febre tifóide em menos de 15 minutos, da disenteria, em 30 minutos, e da cólera, em menos de 5. Em vegetais, entretanto, nem todos os bacilos tifóidicos foram mortos em 40 minutos com 200 p.p.m. de cloro. Acreditou ser isso devido à incapacidade do cloro de alcançar as partes mais profundas das fêlhas e das hastes. Quando removeu as fêlhas crespas e as hastes, 20 p.p.m. foram eficazes em 5 a 15 minutos. Susuki considerou que seria ineficiente a desinfecção em massa de vegetais nos mercados japoneses.

Mc Cleskey e Christopher (126), estudaram, em 1941, a longevidade de certas bactérias patogênicas intestinais em morangos, conservados em determinadas temperaturas. Os frutos foram contaminados com suspensões aquosas das bactérias patogênicas e logo depois foram submetidos ao congelamento a 18° C. Amostras foram tiradas antes da adição das culturas, logo após, e logo depois do congelamento. Em seguida, a intervalos sensíveis, várias amostras foram retiradas. Quando empregou morangos cortados, a Salmonella typhosa sobreviveu 6 meses, a Salmonella acetrycke e a Salmonella schottmülleri, 1 mês. A Salmonella paratyphi não foi isolada nenhuma vez após o congelamento. Em morangos cortados, adoçados, a Salmonella typhosa sobreviveu 14 meses.

Quando a Salmonella typhosa foi inoculada em morangos cortados, adoçados, e as frutas conservadas a 4-5°C, a mortalidade das bactérias foi tal que 98% morreram em 1 dia e, no 8° dia, já não se conseguiu isolá-las. Quando as frutas permaneceram à temperatura ambiente, a 22-27°C, a Salmonella typhosa não foi reisolada após 6 horas.

Dêste trabalho apenas o resumo é apresentado, de modo que não se pode julgá-lo como seria desejável.

Felsenfeld e Young (45), em 1945, investigaram a sobrevivência de Salmonella em vegetais crus, em seguida " a observação de surtos de Salmonella pullorum em pacientes hospitalizados, sem nenhum contacto com aves". Seus estudos foram realizados com Salmonella pullorum, typhimurium, montevideo e oranienburg e grande variedade de verduras.

Acharam que a Salmonella pullorum era capaz de sobreviver 4 a 8 semanas sôbre vegetais, na geladeira a 2-4° C, e 2 a 5 semanas, à temperatura ambiente. Em cebolas, a sobrevivida foi menor. Os outros tipos sobreviveram cêrca de 2 semanas mais que a pullorum.

Gaub (61), relatou o isolamento de Shigella paradysenteriae (Flexner), de couve, cultivada em hortas de Denver, irrigadas com água contaminada por esgotos.

Falk (41), para verificar a possível sobrevivência de bactérias patogênicas intestinais nas condições naturais do cultivo de vegetais, aspergiu suspensão de Salmonella cerro, em solução fisiológica e em emulsão de fezes, sôbre tomates em desenvolvimento. De 31 tomates examinados durante um período de 27 dias após a contaminação, somente um revelou a presença da Salmonella. Este resultado positivo ocorreu em fruto colhido no terceiro dia após a aspersão.

Rudolfs, Falk e Ragotzkie (67), em 1951, relataram experiências realizadas a fim de medir a sobrevivência de patogênicas intestinais, em tomates nas condições naturais. Aspergiram suspensões de Salmonella cerro e de Shigella alkalescens sôbre frutos já desenvolvidos e, a intervalos de dias, colhiam amostras dos tomates para exame.

Numa primeira experiência com a Salmonella cerro, a primeira amostra, colhida 5 dias depois, já não revelou presença do bacilo. Em segunda experiência, tomates colhidos um dia depois do berrifo da suspensão, apresentaram 6000 Salmonelas por grama, 3 dias depois, somente 15, e no 4º dia apenas um tomate mostrou-se contaminado.

A longevidade da Shigella alkalescens sôbre tomates, foi da mesma ordem. Numa experiência, realizada em período de maior inso-

lação e nenhuma chuva, tomates colhidos no momento da contaminação, evidenciaram a presença de 720 shigellas por grama; um dia depois, 450, e no terceiro dia o bacilo não foi mais isolado. Noutra série de medidas, em dias de temperatura mais fresca e com ocorrência de chuva, a redução do número de Shigellas processou-se mais lentamente. Um dia depois da aspersão, o exame revelou 40.000 shigellas por grama, 3 dias depois, 20.000; no 4º dia, somente 190, e 50% dos frutos estavam aparentemente livres dos microrganismos.

Em outra experiência, a aspersão das shigellas foi feita em suspensão de fezes, procurando-se verificar se a presença de fezes oferecia maior proteção ao bacilo. Embora no dia da contaminação, a amostra colhida revelasse 370.000 shigelas por grama, no dia seguinte o número encontrado se reduziu a 10.000, e 24 horas mais tarde não foi mais possível o isolamento da shigela.

Principalmente devido a estes resultados, Rudolfs, Falk e Ragotzkie concluíram que a cessação da aplicação de material fecal fertilizante às plantações, um mês antes da colheita, ofereceria considerável margem de segurança à proteção contra as doenças bacterianas intestinais, mesmo quando os vegetais fôsseis ingeridos crus.

Dunlop, Twedt e Wang (39), isolaram uma única vez, uma cêpa de Salmonella de amostras de aipo.

Lowe (118), em 1952, isolou salmonelas de 3 dentre 11 amostras de água de irrigação contaminada por esgotos. O valor mediano estimado para as 11 amostras foi de 0,9 salmonela por 100 ml. Das 14 amostras de hortaliças, que haviam sido irrigadas com essa água, apenas uma isolou salmonela. Na água de irrigação, encontrou uma razão de 225.000 coliformes e de 4.800 enterococos por salmonela.

Kröger (109), em 1954, isolou Salmonella bareilly de hortaliças, cultivadas em campos irrigados com esgotos gradeados, provenientes de pequena cidade, situada à distância de 5,5 km, onde, 6 meses antes, ocorrera epidemia de gastro-enterite. A mesma salmonela foi isolada do lodo dos esgotos e dos efluentes. Chamou a atenção sobre a eliminação continuada da bactéria 6 semanas após a epidemia e sobre sua resistência a condições desfavoráveis.

Muller (139), em 1957, examinou, a intervalos, amostras de solo e de plantações de batatas, cenouras, repolhos e groselhas, após tê-las aspergido com pequenos volumes de esgotos domésticos, que haviam sofrido apenas alguma purificação mecânica. Isolou salmonelas, até 40 dias depois, do solo e de batatas; 10 dias depois, de cenouras; e de repolhos e groselhas, somente até o quinto dia.

Capítulo V

BACILOS DA TUBERCULOSE EM ESGOTOS E SUA RESISTENCIA A PROCESSOS DE TRATAMENTO

Esgotos e águas contaminadas por esgotos também poderão ser veículos de bacilos da tuberculose. Embora esta doença, comumente, não seja considerada como infecção transmissível, direta ou indiretamente, pela água, a possibilidade da existência de casos adquiridos por essa via não pode ser negada.

O Mycobacterium tuberculosis é encontrado nos esgotos não desinfectados de sanatórios, mesmo que se tome o cuidado de esterilizar os escarros dos pacientes. A desinfectação de que geralmente se lança mão para o tratamento das fezes dos doentes não impede que numerosos bacilos sejam lançados aos esgotos. O mesmo acontece com os esgotos e águas residuárias de instituições que abriguem animais tuberculosos. Em qualquer lugar onde exista gado infetado por essa doença, encontrar-se-ão os bacilos também nos esgotos. É o que pode ocorrer nos matadouros e nos centros de produção de leite. Levados pelo leite, os bacilos poderão existir até mesmo nas águas residuárias das usinas de tratamento laticínios.

Nos esgotos das cidades, o bacilo também poderá ser encontrado, embora em densidades pequenas, naturalmente, dependentes da incidência local da infecção.

Uma revisão rápida da literatura a respeito da presença do Mycobacterium tuberculosis em esgotos e de sua resistência nesse meio, in natura ou após tratamento pelos vários processos usuais, pode ser visto o que segue.

Musehold (140), em 1900, parece ter sido o primeiro a mostrar que os esgotos de um sanatório de tuberculose continham micobactérias capazes de produzir a doença em cobaias. Musehold atribuiu a presença de bacilos da tuberculose vivos nos esgotos somente à não desinfectação dos escarros na instituição.

Esse autor investigou a sobrevivência do Mycobacterium

tuberculosis em várias condições. Juntou escarro com bacilos a esgoto, água de rio e lodo. Da água de rio, após 5 meses no escuro ou à luz difusa natural, pôde isolar bacilos virulentos. No lodo, exposto a condições extremas de temperatura e luz, os microrganismos sobreviveram 6 meses e meio. Submetendo esgotos tratados por precipitação química, à ação da cal clorada, numa concentração de 17 p.p.m. de cloro disponível, não conseguiu obter desinfecção.

Moeller (136), em 1901, além de achar bacilos da tuberculose nos esgotos decantados de um instituto, onde os escarros eram desinfectados, isolou bacilos virulentos de rabanetes de plantação irrigada com esses esgotos.

Logo depois, surgiram vários estudos sobre a presença do Mycobacterium tuberculosis nas fezes de tuberculosos. Laird, Kite e Stewart (113), realizaram, em 1913, uma investigação sobre esta questão e apresentaram revisão da literatura existente. Concluíram que quase todos os doentes com bacilos de tuberculose no escarro, também apresentam bacilos virulentos nas fezes. Portanto, já estava estabelecido nessa época, que nos esgotos de locais abrigando doentes de tuberculose, se encontraria Mycobacterium tuberculosis, a despeito de qualquer tratamento a que os escarros fôsem submetidos.

Brown, Petroff e Heise (18), em 1916, colheram amostras do rio Saranac, após o recebimento dos esgotos do Trudeau Sanatorium, de New York. Conseguiram isolar bacilos da tuberculose até de 5,6 km abaixo do ponto de lançamento.

Crunins, Davies e Acland (32), em 1929, demonstraram a presença de bacilos vivos da tuberculose no efluente do tanque séptico de um sanatório. Em vista desse achado, recomendaram que o lodo de tanques sépticos não fôsse usado como adubo para hortas e nem mesmo para áreas de pastagem.

Em 1930, Williams e Hoy (20), verificaram, por inoculação em cobaias, que o bacilo da tuberculose bovino conservava sua virulência em fezes de vaca, expostas em pastos, durante pelo menos cinco meses no inverno, dois na primavera e quatro no outono. No verão a sobrevivência máxima foi de 2 meses, mas podia atingir a quatro me

ses se as fezes permanecessem ao abrigo da luz solar. Encontraram bacilos de tuberculose vivos e virulentos em fezes naturalmente infectadas, conservadas em lugar fresco e escuro, durante 12 meses e, por período de pelo menos 2 anos, em fezes artificialmente contaminadas. Em esterco líquido, ao qual adicionaram 5.000 bacilos por ml, demonstraram a conservação da sua virulência, embora gradualmente diminuída, durante pelo menos 4 meses.

Maddock (122), em 1933, no sul da Inglaterra, comprovou a sobrevivência de bacilos da tuberculose do tipo bovino, expostos durante 6 meses, a partir de junho, no solo, em fezes de vaca e em mistura de solo e fezes de vaca. Procurou em seguida determinar a sobrevivência dos bacilos, durante o verão, no capim em crescimento. Inoculou áreas diferentes com doses correspondentes a 120.000, 1.200.000 e 120 milhões de bacilos por pé quadrado. A intervalos, cortava o capim de áreas de 1 pé quadrado, de cada um dos diferentes lotes, e submetia-o a lavagem vigorosa em água. O material existente na água era concentrado, tratado e inoculado em cobaias. Apesar de chuvas excepcionalmente fortes, seguidas de grande calor e seca, pôde comprovar a existência de bacilos capazes de provocar a morte de cobaias, no lote menos contaminado, até o 14º dia, no lote intermediário, até o 28º dia, e no lote que recebera o maior número de bactérias, até o 49º dia.

Abshagen e Schinzel (2), comunicaram, em 1935, o isolamento de Mycobacterium tuberculosis de esgotos de hospitais para tuberculosos, mesmo de locais onde os escarros eram esterilizados por vapor e as fezes dos doentes de tuberculose intestinal eram desinfetadas com "Japcol".

Jonsen e Jensen (89), em 1942, também encontraram bacilos de tuberculose vivos em esgotos de sanatórios onde os escarros eram esterilizados pelo calor. Demonstraram que os métodos de tratamento de esgotos, comumente empregados, não proporcionavam redução digna de nota no número de bacilos da tuberculose presentes nos esgotos e discutiram os riscos de infecção associados a essas condições. Em experiência de laboratório, verificaram o efeito do cloro na de -

sinfocção dos esgotos e demonstraram que a concentração de 9 p.p.m. de cloro é capaz, em 1 a 2 horas, de matar de 100 a 100.000 bacilos da tuberculose por ml de esgôto; com B.O.D. de 5 dias de 28 a 43 mg/l. Em seguida realizaram experiências, em condições naturais, com os esgotos de um sanatório onde havia sido instalada moderna estação de tratamento. Mostraram que 10 p.p.m. de cloro, com período de contacto de pelo menos 3 horas, foram suficientes para matar os bacilos da tuberculose existentes nos esgotos, após seu tratamento pelo processo do lodo ativado. O tratamento havia reduzido a quantidade de matéria orgânica a um valor entre 11 e 63 mg/l, em termos do B.O.D. de 5 dias. Jensen e Jensen chamaram a atenção para o fato de lodo dos esgotos dessa estação conter bacilos vivos e virulentos, mesmo após tempo considerável, o que tornava o uso desse lodo como fertilizante, altamente censurável.

Em 1944, de um ponto situado a 1 quilômetro do sanatório, Leriche(114) isolou bacilos da tuberculose, patogênicos para cobaias, do efluente dos esgotos tratados em filtro biológico.

Pramer, Heukelekian e Ragotzkie (157), em 1950, utilizando novo método, desenvolvido por eles mesmos, que compreendia o uso de meio de cultura contendo penicilina e griseína, conseguiram isolar em grande quantidade, bacilos ácido-resistentes, semelhantes quanto à morfologia e às propriedades tinteriais, ao Mycobacterium tuberculosis, dos esgotos "in natura" de um sanatório, do efluente de sua estação de tratamento, do lodo "ripe" amadurecido, dos "sedimentos" recentes, e do curso d'água que recebia o efluente. A concentração desses bacilos ácido-resistentes, por ml, foi a seguinte:

Esgoto <u>in natura</u>	1500
Efluente da estação de tratamento	10
Curso d'água receptor	± 10
Lodo bruto sedimentado	100.000
Lodo digerido	10.000

Os autores chamaram a atenção sobre a necessidade da determinação do tipo e virulência desses bacilos, assim como sobre a vantagem da realização de estudos comparativos em esgotos de outras comu

nidades, para o julgamento do real significado d'êstes resultados.

Usando o mesmo método de determinação quantitativa e trabalhando com uma cêpa de Mycobacterium tuberculosis avium, procuraram determinar a eficiência de vários processos de tratamento de esgotos.

Os resultados obtidos foram:

- 1) A sedimentação durante 6 horas não mostrou mudança significativa no número de bacilos da tuberculose.
- 2) A coagulação química com cloreto férrico, em pH 5.0, seguida de floculação e sedimentação, removeu mais de 99% dos bacilos da tuberculose presentes no esgôto.
- 3) A filtração contínua do esgôto em filtros de arvia removeu 99% dos bacilos originalmente presentes e pareceu ser muito mais eficiente do que a realizada por descarga intermitente.
- 4) A aeração durante 24 horas, à razão de 22 pés cúbicos por galão e por dia, teve pequeno efeito sôbre o número de bacilos da tuberculose.
- 5) A eficiência da cloração foi determinada correlacionando o residual de cloro livre com o número de bacilos da tuberculose sobreviventes. Foi necessário um residual de ~~alg~~ livre de 0.9 p.p.m. para reduzir o número de microrganismos da tuberculose a menos de 5 por ml. Isto equivale a residual de 2-5 p.p.m. pela orto-tolidina, concentração muito mais alta do que aquela mantida para a desinfecção de esgotos comuns.

Kröger e Trettin (110), em 1951, isolaram bacilos da tuberculose dos esgotos de três sanatórios. Provaram a virulência das bactérias, inoculando-as em cobaias, as quais manifestaram tuberculose generalizada.

Em 1954, Jenson (91), em artigo em inglês, no boletim da Organização Mundial de Saúde, sintetizou seu trabalho de 1946 (90),

publicado em dinamarquês, sôbre a ocorrência e destruição de bacilos da tuberculose nos esgotos, trabalho que Greenberg e Kupka (4.), haviam qualificado de monumental. Após citar o encontro, por vários investigadores, do Mycobacterium tuberculosis em efluentes de sanatórios, quer os esgotos tivessem sido tratados ou não, Jensen faz referência ao achado, por Christiansen e Jensen, dos bacilos em águas residuárias de matadouros da Dinamarca.

Jensen, citando resumidamente suas próprias experiências, relata resultados de estudos procedidos nos efluentes de cinco cidades e de um instituto de débeis mentais, com diferentes razões (F) entre o número de tuberculosos eliminadores de bacilos e o número total da população. Relata ter conseguido isolar Mycobacterium tuberculosis até do efluente de uma das estações de tratamento (com f= 1/600), onde a purificação era feita por filtro biológico, seguido de tanque de cantador secundário. Encontrou bacilos de tuberculose no lodo digerido de tôdas as estações de "F", até 1/600. Em lodo sêco (f= 1/460), retirado há 5 semanas do tanque de digestão, foi demonstrada a presença do bacilo, mas não no lodo sêco de outras estações (f= 1/600), retirada de três meses antes. Jensen demonstrou, também, que o tratamento do material de esgôto por hidróxido de sódio, utilizado antes da inoculação de cobaias, ocasionava perda até de mais de 99% dos bacilos da tuberculose. Isto indicava a presença de número considerável de bacilos nos esgotos examinados e a gravidade da questão.

Comentando o risco de infecção que os esgotos de hospitais de tuberculosos podem ocasionar, Jensen lembra os banhos nos cursos d'água receptores, pela aspiração da água contaminada ou seu contacto com as membranas mucosas, e a inalação de gotículas da água, atomizada por ventos fortes, ou o seu uso direto como bebida, e acrescenta: " A purificação dos esgotos de sanatórios por meios de campos de irrigação, tem sido usada na Alemanha até bem recentemente e o método de aspersão também tem sido empregado nesse país, com a mesma finalidade. Ambas as práticas são totalmente injustificáveis, e, no caso de se espargir o líquido, não somente se contaminam as plantações como, pela atomização dos esgotos, cria-se a possibilidade de infecção

por inalação. No que se refere à possibilidade de infecção, as mesmas desvantagens ligadas aos esgotos de instituições de tuberculosos, existem nos efluentes das cidades onde tais instituições estejam situadas, se bem que em grau menor, uma vez que os esgotos contendo os bacilos estarão diluídos nos esgotos totais da cidade".

Gastaud (60), em 1947, Senecal (179), em 1950, Heicken (76) e Schmidt (176), em 1952, e Miller e Anderson (134), em 1954, descreveram casos de primoinfecção tuberculosa, surgidos em crianças, em seguida à inersão prolongada em água contaminada por esgotos, sendo a transmissão pela água a única capaz de explicar a ocorrência.

Em editorial, a revista "Lancet" (140), referindo-se a esses casos, nove, ao todo, chamou a atenção sobre o reconhecimento de mais esse risco de saúde ligado ao banho em águas contaminadas e lembrou também que nenhuma dos métodos de purificação de esgotos, geralmente em uso na Grã Bretanha, resultava em destruição eficaz dos bacilos da tuberculose; que muitos sanatórios se encontram no interior do país, onde não é raro o lançamento dos efluentes em cursos d'água utilizados para banhos, pesca e irrigação de hortas.

A respeito da possibilidade de infecção tuberculosa através de hortaliças contaminadas pela irrigação, poder-se-ia lembrar que a primoinfecção poderia se estabelecer, inclusive, pela mucosa bucal. Miller (133), descreveu, em 1953, 20 casos de primoinfecção tuberculosa da pele e 8 de mucosas, sendo 5 dos olhos e 3 da boca, descobertos, juntamente com mais nove outros não suficientemente documentados, durante período de apenas 5 anos. Dos 20 casos da pele, 9 não apresentavam história de contacto, sendo 2 deles também sem antecedente traumático. Dos 8 casos de mucosas, apenas em um se pôde estabelecer a ocorrência de contacto, não tendo, porém, havido trauma. Dos outros 7 casos, sem contacto, tinha havido trauma em 2 e em 2 outros não ocorrera nenhum trauma visível; quanto aos 3 restantes, a ocorrência ou não de trauma não pôde ser estabelecida com segurança. Três dos 8 casos de mucosa, eram da boca e um deles não apresentava história de trauma.

" O efluente de instituições, onde haja, em tratamento,

pacientes de tuberculose bovina, também pode trazer o risco de infecção ao gado que venha se dessedentar nos cursos d'água receptores.

Por outro lado, a presença do tipo humano do bacilo de tuberculose nos esgotos de um sanatório poderia ser considerada como sendo sem significado especial para o gado, uma vez que tais bacilos são avirulentos ou somente muito ligeiramente virulento para esses animais. Entretanto, o tipo humano pode causar reação positiva de tuberculina no gado...

Stenius (183), em 1941, na Finlândia, verificou que vacas, que bebiam em riacho no qual se descarregava o efluente do tanque séptico de um sanatório, se infectavam com o tipo humano do bacilo da tuberculose".

Jensen relata, em seguida, estudos sobre a desinfecção dos esgotos de sanatórios, feitos em colaboração com K. A. Jensen (89) e, posteriormente, por êle sozinho, e apresenta os resultados de suas investigações para determinar o tempo necessário que o lodo do tanque de Imhoff deve permanecer nos leitos de secagem para se dar a morte espontânea dos bacilos nêle existentes. Suas experiências revelaram que eram necessários de 11 1/2 a 15 meses para não mais ser possível a demonstração de bacilos viáveis no lodo. Experiências sobre a desinfecção química do lodo, demonstraram que, após exposição por uma semana, os bacilos da tuberculose em lodo de tanque de Imhoff, eram mortos por 0,5% de lisol e por 0,1% a 0,2% de formol, mas não por 3,1% de sulfato de cobre, e que o lodo podia ser desinfectado em 24 horas com cloro, em solução do gás em água, pela adição de 12g de cloro para 100g de lodo, peso seco. (to 100g of sludge matter).

Köser (106), em 1954, relatou o achado de bacilos de tuberculose em uma das 228 amostras examinadas dos líquidos residuários de duas usinas de laticínios.

Hoack (71), em estudo de 1954, admitindo que 0.1% do volume total do leite processado numa usina de pasteurização, seja perdido por aerrramamento no chão, indo, assim, ter aos esgotos, sem pasteurização, e que uma vaca com tuberculose marária elimine 150.000.000 de bacilos da tuberculose por dia, estimou que o efluente da usina que tratasse cêrca de 7.600 galões de leite, por dia, conteria, em média, três bacilos da tuberculose, por litro. Se o efluente da urina fôsse

empregado na irrigação por aspersão, haveria uma carga de 30 bacilos por $2,47 \times 10^{-4}$ acres por 17 dias. Sob condições constantes, Haack concluiu que poderia haver 450.000 bacilos da tuberculose, vivos e infecciosos, por acre ($111m^2$).

Kelly, Clark e Coleman (97), em 1955, trabalhando com técnica própria e partindo de amostras simples, colhidas diretamente, e de amostras concentradas, obtidas por meio de chumaços de gaze, mergulhados 24 horas no curso d'água ou esgotos em exame-processo de Moore - (137), isolaram bacilos da tuberculose, virulentos para cobaias, dos esgotos de vários sanatórios, tratados por diversos processos. Chegaram a isolar bacilos virulentos das águas de um ribeirão, em um ponto situado a 300 metros do lançamento do efluente dos esgotos de um sanatório. Esses esgotos eram tratados por sedimentação, filtração em filtro biológico e clarificação secundária acompanhada por cloração.

Em 1956, Heukelekian e Albanese (79), realizaram estudos sobre a enumeração e sobrevivência de bacilos da tuberculose humanos, nos esgotos.

Numa primeira investigação (78), desenvolveram método mais eficiente para a determinação de número de bacilos nos esgotos. Compararam o emprêgo de antibióticos no meio de cultura com o tratamento prévio da amostra por cloração controlada e por "Bradosol", composto quartenário do amônio, empregado pela primeira vez, com essa finalidade, por Wagener, Mitscherlich e Reuss (202).

Nesse trabalho puderam verificar que a cloração de amostras de esgotos a um residual de 0,5 a 1,0 p.p.m., segundo determinação pela ortotolidina, após período de contacto de 30 minutos, suprimia em proporção substancial, mas não completamente, as bactérias saprófitas e proporcionava recuperação de 50 por cento dos bacilos da tuberculose; que o tratamento das amostras com 500 p.p.m. de "Bradosol", por 20 minutos, permitia a supressão total dos saprófitas e recuperação de 70 a 80 por cento do Mycobacterium tuberculosis (hominis).

Na investigação posterior (98), ainda em 1956, os autores apresentaram os resultados de suas investigações sobre a resistência do bacilo da tuberculose a vários processos de tratamento de esgo

tos. Na enumeração dos bacilos, empregaram os métodos de tratamento das amostras pelo cloro e pelo "Eradosol".

Nos esgotos brutos de cinco sanatórios, puderam determinar a existência de 425 a 10.000 bacilos da tuberculose por ml. Os resultados obtidos após as várias fases de tratamento investigadas, levaram os autores às seguintes conclusões: a) a sedimentação simples, tratamento em tanque séptico, filtro biológico e lodo ativado não se mostraram eficazes na remoção de bacilos da tuberculose; b) a coagulação química com clorato férrico e a filtração lenta intermitente em arcia revelaram-se capazes de realizar remoção de mais de 99 por cento dos bacilos; c) é necessário cloração residual de 2 p.p.m. e período de contacto de 30 minutos para a destruição eficaz dos bacilos; com residual de 1 p.p.m., o tempo de contacto de 1 hora parece suficiente; entretanto, esgotos submetidos somente a decantação primária, requererão dosagens maiores de cloro e, possivelmente, maiores residuais, do que os esgotos sujeitos previamente a processo de tratamento secundário; d) lodos produzidos por métodos de tratamento primários e secundários, continham grande número de bacilos; a digestão anaeróbica do lodo não os destrói; a secagem do lodo ao ar, sobre leitos descobertos de areia, não é processo satisfatório de destruição dos bacilos da tuberculose; e Mycobacterium tuberculosis, var. hominis, morre mais rapidamente quando suspenso em água do mar do que em água salobra e, nesta, mais que em água doce.

Capítulo VI

VÍRUS DA POLIOMIELITE, COXSACKIE E DA HEPATITE INFECCIOSA: PRESENÇA NAS FEZES, NOS ESGOTOS, NA ÁGUA E SUA RESISTENCIA

a) Vírus da poliomielite

Desde que Kling, Petterson e Wernstedt (104), por ocasião da epidemia de 1911 na Suécia, isolaram o vírus da poliomielite de material colhido do colon humano, inúmeras têm sido as investigações sobre a presença do vírus nas fezes. À medida que os métodos de pesquisas se aperfeiçoaram, tornára-se claro que a excreção do vírus nas fezes dos doentes, tanto da forma paralítica como da não paralítica da infecção, era fato normal e passou-se a procurar determinar a duração de tal ocorrência. Posteriormente, as pesquisas se intensificaram em relação aos casos de formas frustas de poliomielite e aos contatos com sintomas.

Van Rooyen e Rhodes (199), apresentaram extensa bibliografia a respeito, em 1948. A fim de ilustrar estes pontos, entre os numerosos trabalhos publicados, poder-se-ia citar os seguintes:

Lépine, Sedallian e Sautter (115), em 1939, demonstraram a presença de vírus nas fezes de uma criança, até 123 dias após ter apresentado sintomas de poliomielite frusta, o que parece ser ainda o caso de excreção de vírus mais longa que se conhece.

No mesmo ano de 1939, Kramer, Gillian, e Molner (108) puderam deixar bem comprovada a existência de vírus entre os contactos sadios de casos clínicos de poliomielite, tanto entre crianças, infantes, como entre adultos.

Trask, Paul e Vignoc (196), em 1940, isolaram o vírus da poliomielite das fezes de 8 doentes portadores de formas características da infecção, mas não conseguiram o seu isolamento das fezes de outros 45 pacientes, também com diagnóstico clínico de poliomielite. Após a quarta semana da doença não obtiveram nenhum caso positivo. Entre as conclusões, afirmaram que o vírus era encontrado mais facilmente nas fezes de crianças e nas dos casos não paralíticos, embora seus dados não justificassem tal generalização.

Puderam verificar a grande resistência do vírus nas fezes,

isolando-o também de amostras tratadas pelo éter, provenientes da Inglaterra, e que haviam passado 12 a 17 dias, em pleno verão, na viagem transatlântica. Os autores, nesse trabalho, apresentaram revisão da pequena literatura existente até então, sobre a presença do vírus da poliomielite nas fezes.

Mc Clure e Langmuir, em 1942, relataram os resultados dos exames das fezes de 5 pacientes de poliomielite paralisante e de 27 pessoas sem sintomas, que haviam tido contato íntimo com os doentes. O vírus pôde ser isolado de 4 dos doentes e de 20 dos contatos.

Horstmann, Ward e Melnick (121), em 1944, estudaram a duração da excreção do vírus nas fezes de doentes de poliomielite. Durante as duas primeiras semanas após o início da doença, encontraram 61% dos doentes excretando o vírus; na terceira e quarta semanas, 50%; na quinta e sexta, 27% e na sétima e oitava, 12,5%. Na décima segunda semana, ainda isolaram o vírus das fezes de um doente. Não encontraram diferença na quantidade de vírus excretada nas fezes de crianças de menos de 8 anos de idade, quer na fase aguda da doença, quer no período de convalescença, nem tão pouco entre os doentes paralisantes e os portadores de formas não paralisantes.

A última observação foi também verificada por Schabel, Smith, Fishbein e Casey (84), em 1950. Investigaram a presença do vírus nas fezes de 83 crianças, que haviam estado em contato com casos clínicos de poliomielite e que apresentaram um ou mais sintomas compatíveis com a forma sub-clínica dessa infecção, dentro das três primeiras semanas após o contágio. As percentagens de positividade obtidas na semana antes do aparecimento do primeiro sintoma, no dia desse aparecimento e nas quatro semanas seguintes, apresentaram-se em estreita concordância com as já relatadas por vários investigadores, para os casos clínicos da doença. Concluíram os autores que não havia evidência de que a quantidade do vírus e a duração de sua excreção nas fezes, fossem diferentes nos dois tipos de poliomielite.

Melnick e Agren (131), em 1952, puderam verificar que em zonas de baixo nível de saneamento, não é difícil isolar o vírus da poliomielite das fezes de crianças normais, mesmo em épocas não epidêmicas. Demonstraram sua presença no material colhido por "swab" retal, de uma de 36 infantes, de 6 a 12 meses de idade, tendo examinado apenas uma única amostra de cada um.

Em 1956, Honig, Melnick, Isacson, Parr, Myers e Walton (83) publicaram importante trabalho epidemiológico sobre a distribuição de vírus intestinais em 136 crianças norte-americanas normais, pertencentes a dois grupos sócio-econômicos diferentes. A duração do estudo foi de 29 meses, e a idade das crianças, no início das investigações, variava de duas semanas a 4 anos. Puderam determinar a incidência estacional da excreção dos vírus, mais de 90% dos isolamentos tendo ocorrido nos meses de Junho a Outubro. Das 592 amostras de fezes do grupo sócio-econômico inferior, 8,3% revelaram a presença de vírus intestinal, enquanto o mesmo sucedeu com apenas 3,1% das 966 amostras do outro grupo, o qual vivia em distrito da classe média superior, em condições boas de saneamento do ambiente. Dentre as 77 amostras de vírus isolados em culturas de tecido de rim de macaco, 44% eram do grupo ECHO, 37% vírus Coxsackie, e 19% vírus da poliomielite. Não observaram, durante todo o período da investigação, nenhum caso clínico típico de poliomielite.

Em 1955, Brown(15), relatou entre outros resultados o isolamento de vírus em cultura de tecido, a partir de material de casos clínicos e sub-clínicos ocorridos em 1953. O vírus foi isolado de 7 de 8 amostras de fezes de casos paralíticos e de somente 8 de 18 amostras provenientes de casos não paralíticos. O título do vírus, em média, não apresentou, porém, diferença significativa nos dois sub-grupos. Entre os comunicantes de ambos os casos, pôde demonstrar a presença de vírus nas fezes de 41% dos contactos aos casos nos quais comprovava eliminação fecal do vírus e de somente 6% daqueles que tinham tido associação com os casos negativos. Ainda aqui, não verificou diferença significativa do título do vírus entre um e outro grupo. Brown chegou a observar título de 10^{-6} , num dos espécimes examinados e que provinha de comunicante assintomático.

Paul (119) refere casos em que se encontraram títulos dessa ordem, mesmo quando medidos pela inoculação em macacos. Assim, um grama de fezes pode chegar a ter um milhão de doses infecciosas para esse animal. Diante da quantidade de vírus que pode estar presente nas fezes e diante da frequência de fezes positivas, até mesmo entre os casos de infecções inteiramente subclínicas, não é de admirar que o vírus da poliomielite possa ser encontrado com relativa facilidade nos esgotos de comunidades. Tal fato poderia não ser esperado, somente se o vírus fôsse muito sensível à ação de agentes químicos. Entretanto, de maneira geral, o contrário parece verdadeiro.

Assim, é conhecida a extraordinária resistência do vírus à glicerina e ao éter. A última propriedade é ainda hoje utilizada em técnicas de isolamento, permitindo grande redução do número de bactérias existentes no material, aparentemente sem afetar o vírus. Rhoads (161) verificou que a virulência da mistura de duas cêpas de vírus da poliomielite, conservada 8 anos a 4°C em glicerina a 50%, permanecera quase a mesma. Schultz (173) submeteu suspensão límpida de vírus à solução concentrada de éter, durante 15 dias, a 20°C, sem destruição da infectibilidade da suspensão. Schultz e Robinson puderam verificar que suspensão de fezes de um doente de poliomielite era ainda infecciosa após permanência de 7 meses em geladeira, em presença de excesso de éter.

De acôrdo com experiência de Flexner, Clark e Amoss (47), um filtrado em Berksfeld, de uma suspensão preparada a partir da medula humana, submetido à ação de fenol a 0,5%, ainda era infecciosa após 5 dias a 22°C. O fenol não teria, portanto, ação muito intensa sobre o vírus.

Clark, Schindler e Roberts (26) verificaram grande resistência do vírus à solução saturada de cloreto de sódio.

Schultz e Robinson (174) investigaram a resistência do vírus a 112 compostos químicos. A experiência, apesar de superficial, na maior parte dos casos revestindo-se do aspecto de triagem preliminar, indicaria a grande resistência do vírus à grande maioria dos compostos experimentados, assim como sua extraordinária tolerância a grandes variações de concentração hidrogeniônica.

Barski, MacDonald e Slizewicz (5), estudaram a tolerância do vírus poliomiéltico à ação do suco gástrico humano, recolhido por entubação, após injeção subcutânea de histamina. A sobrevivência do vírus foi verificada pela inoculação em cultura de células. O tempo de exposição do vírus às 37 diferentes amostras de suco gástrico foi sempre de 30 minutos, a uma temperatura de 37° C. Concluíram que, nessas condições, talvez mais severas que as naturais, o vírus resistia muito bem ao suco gástrico, excetuando-se apenas os casos de acidez máxima.

Gard (57), apresentou excelente revisão crítica das investigações mais importantes realizadas sobre a ação de fatores físicos e químicos sobre o vírus da poliomiéltite. A conclusão geral seria que, se esse vírus parece manifestar, frente aos diversos agentes físicos, uma sensibilidade da mesma ordem que aquela apresentada pelos outros vírus e bactérias patogênicas não esporuladas, em relação a inúmeros grupos de agentes químicos demonstra resistência fora do comum. Gard resume suas apreciações sobre a questão, da seguinte forma: "Em termos gerais, os vírus do grupo poliomiéltico encontram-se entre os mais resistentes de todos os vírus animais conhecidos".

Dada essa apreciável tolerância a tantos agentes químicos e a sua possível presença nas fezes, às vezes em densidades tão elevadas, era previsível o seu achado nos esgotos. Já em 1939, Paul, Trask e Culotta (150), comunicaram o primeiro isolamento do vírus a partir desse material. A amostra de esgotos era de Charleston, S. C., cidade onde ocorria uma epidemia de poliomiéltite, e provinha de zona onde se localizava o hospital que abrigava os doentes atacados pela infecção e na qual também se registrava o maior número de casos da doença. Kling (101), também em 1939, durante epidemia de cerca de 70 casos que ocorria em Estocolmo, conseguiu isolar o vírus dos esgotos.

Paul, Trask e Gard (151), em 1940, descreveram mais detalhadamente o achado do vírus nos esgotos de Charleston e comunicaram novos isolamentos realizados a partir de amostras de esgotos de

Detroit e Buffalo, também durante períodos epidêmicos. Estimaram que no ponto da canalização onde foram colhidas as amostras de Charleston, fluíam, por minuto, cêrca de 18.000 doses infecciosas para macaco, de vírus da poliomielite.

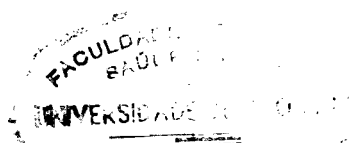
Em artigo publicado em 1941, Paul e Trask (152), discutiram nówamente êsses achados. Chamaram a atençaõ ao fato de que, fora da ocasiãõ de epidemias, não haviam conseguido isolar o vírus de esgotos.

Os mesmos autôres (152), em 1942, descreveram novas investigações realizadas com amostras de esgotos de New Haven e de Nova Iorque. Sõmente numa única amostra desta última cidade foi conseguida a evidenciaçaõ do vírus.

Em 1947, Melnick (128), publicou os resultados de suas importantes investigações sôbre a presença do vírus da poliomielite em esgotos de grandes cidades, em ocasiões de epidemias e fora delas. Durante a epidemia de 1943 em Chicago, isolou o vírus do efluente de tanques Imhoff em duas ocasiões. Também encontrou o vírus em amostra de esgõto in natura, colhida numa estaçaõ de tratamento que servia a outra parte da cidade, e nos esgotos de uma área residencial, na qual, no momento, não havia nenhum caso patente de poliomielite nem se revelou nenhum caso em seguida. Após o fim da epidemia todos os exames foram negativos.

Com amostras de esgotos brutos de Nova Iorque, colhidas em estaçaõ de tratamento, que servia uma populaçaõ de 625.000 pessoas, realizou exames mensais, de 1940 a 1945, inclusive. Em 4 dos 6 anos, pôde demonstrar a presença do vírus nos esgotos, às vêzes quando havia sõmente 4 ou 5 casos reconhecidos na área, durante o mês. O vírus não foi isolado em 2 dos 6 anos e num dêles não havia casos comunicados na área em estudo. O vírus só foi encontrado nos meses do fim de verão e no outono. Em 1944, ano de epidemia de pequenas proporções, o vírus pôde ser isolado durante 4 meses seguidos.

Melnick apresentou estimativa mostrando que, em Chicago, na ocasiãõ da coleta, fluíam da estaçaõ de tratamento, por minu



to, 6 milhões de doses infecciosas para macaco e que em Nova Iorque, 500.000 doses por minuto entravam numa estação de tratamento.

A base de determinações feitas em macacos, achou que 100g de fezes podiam conter, em média, 10.000 doses infecciosas de vírus, e, partindo dêstes dados, sugeriu que cêrca de 6% das pessoas em Manhattan podiam ter sido portadoras do vírus da poliomielite nos outonos de 1940, 1941, 1944 e 1945.

MacCallum, Goffe, Beveridge, Phipps, Macrae e Cockburn, (120), na Inglaterra, utilizando a técnica do "chumaço de gaze", de Moore (137), isolaram o vírus dos esgotos de duas comunidades, onde não se registrara nenhum caso reconhecido de poliomielite em 1951, ano em que realizaram as investigações.

Francis, Brown e Ainslie, (51), em 1953, relataram o isolamento de várias amostras de vírus da poliomielite de material colhido, em 1948, em fossas negras de quatro pequenas cidades do Texas, situadas em região onde ocorria epidemia de poliomielite. Muitas das fossas examinadas eram de quarteirões onde não haviam sido registrados casos da doença. Em uma das comunidades, onde nenhum caso havia sido observado, conseguiram isolar o vírus de 4 de 12 "pools" de fezes, colhidas de 100 fossas negras.

Kelly, Winsser e Winkelstein (98), procurando melhorar os métodos de isolamento de vírus de esgotos, examinaram os esgotos de várias comunidades de duas áreas do estado de Nova Iorque, durante os anos de 1954 e 1955, através de técnicas diferentes. Examinaram, ao todo, 308 amostras de esgotos, tâdas colhidas por "chumaços de gaze". De 21% das amostras, isolaram o vírus da poliomielite. Os isolamentos sômente foram obtidos no verão e outono. Não puderam observar nenhuma correlação entre os isolamentos e o número de casos paralíticos de poliomielite conhecidos, ou o estado sócio-econômico da comunidade. Obtiveram isolamento de vírus intestinais (os autôres não especificaram de que espécie) tanto de esgotos brutos, efluentes de estações de tratamento primário, como de efluentes de filtros e de pontos de lançamento de estação de tratamento secundário. Alguns isolamentos foram conseguidos de cursos d'água recepto-

res, a alguns pés de distância do ponto de lançamento. Do efluente clorado de uma estação de tratamento secundário, nenhum isolamento foi obtido.

Entretanto, foram isolados alguns vírus do seu curso d'água receptor, a vários metros de distância do lançamento. Esta anomalia foi explicada pela drenagem de leitos de secagem de lodo nesse ponto.

Podendo estar presente nos esgotos, em densidades, por vezes, tão elevadas, e sendo dotado de capacidade de resistir a vários agentes químicos, deveria o vírus da poliomielite permanecer plenamente ativo também nas águas receptoras de esgotos, e, talvez, por longo tempo. Existe comprovação, embora realizada em condições artificiais de laboratório, da longa manutenção da atividade do vírus na água, que indicaria essa possibilidade. Kling, Levaditi e Lépine (105), em 1929, verificaram que suspenso em água de torneira, esterilizada, conservada no escuro, à temperatura ambiente, o vírus ainda era infeccioso após 114 dias.

Apesar disso, poucas vezes tem havido evidência suficiente para culpar o suprimento d'água como fonte de infecções de poliomielite. Vários autores, porém, têm chamado a atenção sobre a possibilidade da sua ocorrência. E na Suécia, Kling chegou mesmo a defender a teoria da transmissão hídrica da poliomielite.

A literatura registra, porém, apenas dois casos de isolamento do vírus a partir da água, o de Kling, em (101) 1939, e o de Toomey e Takacs, (105) em 1945. E sobre o último poderia ainda pairar certa dúvida sobre se realmente seria vírus da poliomielite. Os próprios autores, embora no título de sua comunicação tenham se referido a isolamento do vírus da poliomielite, no texto classificaram o agente isolado apenas como "provavelmente pertencendo ao grupo da poliomielite".

A diluição em que o vírus normalmente se encontraria nas águas e a técnica trabalhosa e dispendiosa de seu isolamento, empregada até há pouco tempo, poderiam explicar muitos dos insucessos ocorridos na pesquisa do vírus na água. No entanto, os modernos

procedimentos de coleta do material pelo "chumaco de gaze" de Moore (137) e de isolamento em cultura de células, permitindo, de um lado, grande concentração do material e, de outro, fácil repetição de tentativas, poderiam alterar essa situação, talvez bastante facilmente.

b) Vírus "Coxsackie"

Em 1948, Dalldorf e Sickles (35) comunicaram a descoberta, realizada no ano anterior, de agentes filtráveis, patogênicos para camundongos e "hamsters", somente quando de poucos dias de idade, e que haviam sido isolados das fezes de duas crianças com diagnóstico clínico de poliomielite. Trabalhos posteriores de Dalldorf, Sickles, Ploger e Gifford (36), e de Melnick, Shaw e Curnen (129) levaram ao isolamento de novas amostras desses agentes e à caracterização de um novo grupo de vírus, que, por proposta de Dalldorf, ⁽³⁴⁾ em 1949, receberam o nome de vírus Coxsackie.

Inúmeras pesquisas sobre este grupo de vírus sucederam-se rapidamente e seu extenso papel patogênico pôde ser prontamente estabelecido. Assim, comunicação de Curnen, Shaw e Melnick (33) sobre o isolamento de amostra de vírus Coxsackie, das fezes de um doente apresentando um quadro clínico de pleurodinia, ou doença de Bornholm, e que foi seguida pelo estudo de Shaw, Melnick e Curnen (30), de casos semelhantes a pleurodinia, ocorridos em pessoal de laboratório que trabalhava com essa mesma amostra, provocou várias investigações que deixaram bem comprovado o papel dos vírus Coxsackie na etiologia dessa doença. Logo depois, as pesquisas de Huebner, Armstrong, Beeman e Cole (87), e de Huebner, Cole, Beeman, Bell e Peers (88), estabeleceram os vírus Coxsackie como responsáveis pela herpangina. Ainda nos casos desta infecção, foram os vírus encontrados nas fezes. A continuação dos estudos sobre esses vírus veio evidenciar o fato de serem eles causadores de várias outras infecções, apresentando quer formas febris indefinidas, quer formas nervosas bastante caracterizadas. As primeiras podem apresentar quadros clínicos variados, de sintomas gerais, simulando casos de gripe e ou -

tros, ou de sintômas localizados, como distúrbios gastro-intestinais, anginas, etc.. Entre as segundas, encontram-se casos de "meningite asséptica", encefalite, meningoencefalite e síndrome de Guillain-Barré^(*).

Em tôdas as modalidades das doenças causadas por êsses vírus, foram êles encontrados nas fezes dos pacientes e, muitas vêzes, também nas de percentagens consideráveis de seus comunicantes, apresentando quadros frustos da infecção ou assintomáticos. Revisão completa da literatura a respeito dos estudos dessa natureza foi apresentada por Góes (62), na primeira parte de seus "Estudos sôbre os vírus COXSACKIE" na qual empreendeu o exame crítico e a sistematização dos conhecimentos atuais sôbre os vírus Cocksackie e as cocsackioses. Pelos trabalhos citados pelo referido autor, pode-se ver que a eliminação do vírus nas fezes se inicia muito precocemente e persiste por tôda a duração da doença. Às vêzes pode continuar durante cêrca de dois meses.

Sendo êsses vírus dotados de grande resistência, seria de esperar a possibilidade de seu isolamento a partir de esgotos. Como os da poliomielite, os vírus Cocksackie apresentam, por exemplo, tolerância extraordinária a diferentes pH. Robinson (162), em 1950, verificou que, à temperatura ambiente, tôdas as amostras examinadas resistiram por 1 dia a pH de 2,3 a 9,4, e, por 7 dias, a pH de 4,0 a 8,0; duas amostras mostraram-se capazes de sobreviver 7 dias a pH de 2,3 a 9,0.

Ainda como acontece com o vírus da poliomielite, a glicerina parece agir sôbre êsses vírus mais como agente conservador e o éter, de maneira geral, não tem ação sôbre êles.

Segundo Melnick (130), em tecidos infetados, os vírus resis

(*) Esta citação das infecções produzidas pelos vírus Coxsackie segue, embora não na ordem original, a sistematização das cocsackioses proposta por Góes e Travassos (63).

tem cêrca de 70 dias, se conservados em glicerina a 50%, e o éter tem sido empregado no tratamento de fezes e esgotos para isolamento de vírus.

Este vírus, também de acôrdo com Melnick se têm mostrado resistentes e agentes bactericidas empregados comumente, como "Roccal" a 1% e "Lysol" a 5%, que exercem apenas pequeno efeito sôbre eles.

O seu isolamento dos esgotos era, pois, previsível. Melnick no verão e outono de 1948, examinou amostras de esgotos de 6 cidades, 3 de Connecticut e 3 de North Carolina e pôde isolar vírus dos esgotos de tôdas elas, em geral, de várias amostras sucessivas.

No trabalho publicado em 1953, já referido, Francis, Brown e Ainslie (51) relataram o isolamento de várias amostras de vírus Coxsackie, além das de vírus da poliomielite, em amostras colhidas em fezes de quatro comunidades de um município do Texas, durante uma epidemia de poliomielite na região.

Em amostras de esgotos de Albany e cidades vizinhas, colhidas, pelo método do "chumaço" de gaze", de julho de 1952 a março de 1953, Kelly (98), concentrando o material através do emprego de resina treacadora de sílica pôde isolar inúmeras amostras de vírus Coxsackie. Confirmou mais uma vez, a distribuição sazonal de vírus nos esgotos, encontrando-os em maior quantidade desde julho até princípio de setembro. Em uma estação de tratamento, na qual os esgotos eram submetidos à sedimentação primária, clarificação em filtro biológico, e sedimentação secundária com cloração simultânea, Kelly pôde isolar o vírus no tanque de dosagem do filtro biológico e no efluente do filtro, não tendo conseguido isolá-lo de influente bruto, influente do tanque de sedimentação primária, nem de efluente do tanque de sedimentação secundária.

Em 1954, Melnick, Emmons, Coffey e Schob⁽¹³²⁾, publicaram suas importantes investigações sôbre a ocorrência dêsses vírus em esgotos e em nêscas. Esse estudo foi levado a efeito durante até 4 anos em 6 estados norte-americanos, tendo sido realizados 1.929 exames, que forneceram o total de 269 isolamentos do vírus, 240 tendo sido obtidos de esgotos.

As conclusões gerais foram de que em quase tôdas as áreas urbanas estudadas, o vírus pode ser encontrado nos esgotos no verão e outono, desaparecendo, praticamente, durante o inverno e a primavera. Nos meses frios, o vírus pode ser encontrado, porém, só raramente. O vírus pode ser isolado tanto do influente como do efluente de estações de tratamento.

Kelly, Clark e Coleman,⁽⁹⁷⁾ em 1955, relataram o isolamento de vírus Coxsackie em amostras de esgotos colhidas durante os anos de 1952, 1953 e 1954 nas estações de tratamento de duas cidades do estado de Nova Iorque, Albany e Colonie. Concluíram que os vírus ocorriam nos esgotos continuamente, de junho a novembro e, esporadicamente, no restante do ano. De fim de julho ao princípio de setembro verificaram a presença de maiores densidades dos vírus. A densidade máxima ocorreu em agosto. Também notaram flutuações durante o dia, sendo os vírus encontrados de manhã e não à tarde.

Na estação de tratamento de Albany, puderam recuperar o vírus regularmente, tanto do influente como do efluente. Verificaram fato semelhante em outras estações de tratamento que empregavam o mesmo processo, sedimentação em tanque Imhoff. O tratamento secundário empregado em Colonie, filtro biológico seguido por sedimentação e cloração simultâneas, também nem sempre se mostrou eficaz; entantanto, a estação se achava sobrecarregada, com freqüentes dificuldades mecânicas, e, como resultado, o residual de cloro muitas vezes era igual a zero.

Kelly, Winsser e Winkelstein,⁽⁹⁸⁾ em 1957, comunicaram os resultados dos exames de esgotos de duas áreas do estado de Nova York, feitos com regularidade em 1954 e 1955, comparando métodos de isolamento de vírus intestinais. Do total de 308 amostras de esgotos, foram isolados vírus Coxsackie de 42% e vírus de poliomielite de 21%. Os vírus só foram encontrados do princípio do verão ao fim do inverno. Ambos os vírus puderam ser isolados de esgotos brutos, efluentes e pontos de descarga de estações de tratamento secundário. Às vezes conseguiram demonstrar a presença de vírus nos cursos d'água receptores, embora a curta distância do ponto de descarga. Do efluente clorado de estações de tratamento secundário nenhum isolamento foi

conseguido. No entanto em seu curso d'água receptor, a alguns metros do lançamento, foram encontrados vírus, o que os autores atribuíram à drenagem dos leitos de secagem do lodo.

O vírus de hepatite infecciosa, que também é eliminado nas fezes dos pacientes, como foi verificado, entre outros, por Mac Callum e Bradley (119) Havens, Ward, Drill e Paul (74) e por Neef e Stokes (141), pode ser transmitido pela água. Epidemias hídriceas dessa infecção já foram descritas. Fraser

Fraser (53), em 1931, apresentou o estudo de 173 casos de icterícia catarral, precedidos de epidemia de cêrca de 600 casos de gastro-enterite, ocorridos entre os estudantes de universidade canadense. O inquérito epidemiológico somente pôde incriminar a água como veículo das infecções. Em 1943, Hallgren relatou epidemia no norte da Suécia que também parece ter sido transmitida pela água.

Neef e Stokes, em 1945, descreveram epidemia de hepatite infecciosa, que atacou 350 das 570 pessoas em um acampamento de verão para rapazes e moças. Toda a evidência disponível indicou ter sido o vírus transmitido pela água de um poço, contaminado por fossa absorvente, situada a 50 m, e que recebia os esgotos de uma das cabines e da enfermaria.

A presença do vírus na água incriminada foi confirmada pela sua ingestão por voluntários.

Neef, Stokes, Daty e Reinhold (142), em 1945, estudaram a ação do cloro sobre o vírus da hepatite.

Concluíram que:

1) Em água contaminada com 55 p.p.m. de fezes, contendo o vírus de hepatite infecciosa, o tratamento por cloro, suficiente para dar residual de 1 p.p.m., após contacto de 30 minutos, não inativou o vírus e nem o atenuou.

2) O tratamento com cloro, suficiente para dar residual de 15 p.p.m. após contacto de 30 minutos, resultou em real atenuação do agente da hepatite.

3) A inativação completa do agente causador da hepatite infecciosa na água, poderá requerer modificação dos métodos usados na desinfecção da água.

Capítulo VII.

PARASITOS ANIMAIS; RESERVA GEL. DE CISTOS DE PROTOZOÁRIOS E OVOS DE HELMINTOS NO MEIO EXTERIOR

Entre os parasitos animais cuja transmissão ao homem pode ser feita por intermédio do manuseio de hortaliças ou pela sua ingestão quando cruas, encontram-se protozoários e helmintos.

Dentre os primeiros, acham-se a Endamoeba histolytica, a Giardia lamblia e o Balantidium coli.

Entre os segundos, considerando apenas os existentes no Brasil, estão os cestódeos Taenia solium, Taenia saginata, Hymenolepis nana, Hymenolepis diminuta e Echinococcus granulosus; o trematódeo Schistosoma mansoni; e os nematódeos Ascaris lumbricoides, Trichocephalus trichiurus, Strongyloides stercoralis, Necator americanus, Ancylostoma duodenale, Ancylostoma braziliense e Enterobius vermicularis.

Dos protozoários, destacar-se-ia naturalmente, pelo seu papel altamente patogênico, a Endamoeba histolytica.

Dos helmintos, aquêles cuja fase larvária é a infestante para o homem, devem constituir problema bem menos importante do que os adquiridos pela ingestão de ovos. E, dêstes últimos, a infestação pelo Echinococcus granulosus, na maior parte do território brasileiro, poderia representar apenas uma possibilidade remota; a cisticercose humana pela Taenia saginata é doença de extrema raridade; a infestação do homem pela Hymenolepis diminuta também se reveste de caráter excepcional; e a transmissão do Hymenolepis nana pelas hortaliças, embora possível, normalmente não seria tão fácil quanto, por exemplo, a do Ascaris lumbricoides ou do Trichocephalus trichiurus porquanto, dada a pequena resistência dos ovos do Hymenolepis nana no meio exterior, seriam necessárias circunstâncias mais especiais para se estabelecer o ciclo da infestação. Segundo Pessoa (195), citando Spindler, os ovos desse cestódeo, no solo, morrem em 3-4 dias, e na água perdem sua infectuosidade depois de 3 dias. Portanto, sômen

te quando o ciclo da eliminação dos ovos, contaminação do vegetal e sua ingestão puder se dar dentro desse período, poderá ocorrer a transmissão do cestóideo por essa via. Naturalmente, isso dificultaria o processo. Considerando-se apenas o caso dos consumidores, muito mais importante pelo grande número que representam, o ciclo somente seria estabelecido quando as condições de distribuição das verduras permitissem sua ingestão dentro de 3 dias após a última rega ou a lavagem com água recém contaminada. Esta ocorrência, entretanto, é perfeitamente possível.

Quanto ao caso do Schistosoma mansoni, não se tem elementos para julgar da importância da possibilidade de sua transmissão através de vegetais. Naturalmente o plantio de verduras em solo recoberto d'água, como acontece com o agrião, tornaria sua contaminação quase certa sempre que a água contivesse cercárias. A irrigação de qualquer vegetal por aspersão ou sua lavagem, após a colheita, com água contendo cercárias, produziria o mesmo resultado. Uma vez realizada a colheita, enquanto as hortaliças permanecessem molhadas, as cercárias poderiam, dentro de seu período de vida, continuar ativas e capazes de infestar tanto a pessoa que manuseasse o vegetal como quem viesse a ingeri-lo. No entanto, na prática, os parasitologistas não costumam incluir a esquistossomíase entre as helmintíases de transmissão provável através das verduras e consideram nesse grupo apenas a cisticercose (quase sempre a Taenia solium) e as infestações por Ascaris lumbricoides, Trichocophalus trichiurus e Enterobius vermicularis, esta última nem sempre citada.

FAZOCÁRIOS: Craig e Fornst (30), após apresentarem dados acerca do grande número de cistos que uma pessoa pode eliminar por dia - variável de 330 mil a 40 milhões - comentam a resistência dos cistos, da seguinte maneira: "Os cistos da E. histolytica são resistentes a certos agentes físicos e químicos e podem permanecer vivos em matéria fecal, ou outras, por período considerável de tempo. Em fezes, conservadas úmidas e frescas, os cistos podem permanecer vivos por mais de 12 dias; em água, de nove a trinta dias, variando com sua contaminação bacteriana sendo tanto mais curto o período de sobrevi

vência, quanto maior o número de bactérias e mais alta a temperatura. Os cistos são mortos rapidamente pela dessecação e seu ponto térmico de morte é 50° C."

Como exemplo da resistência dos cistos a agentes químicos, citam sua sobrevivência após exposição de 30 minutos à solução a 1:2,500 de bicloreto de mercúrio e de 24 a 48 horas, à solução de formalina a 0,5%.

A respeito da epidemiologia da Giardia lamblia, dizem que sua transmissão depende da ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas por fezes contendo os cistos, e que tal contaminação pode ocorrer de qualquer dos modos mencionados na discussão da epidemiologia da Endamoeba histolytica. Apresentaram os cistos como sendo muito resistentes, e capazes de viver em água potável por 4 dias, pelo menos.

Em sua monografia sobre a amebíase, Faust (44), ao discutir a sobrevivência da Endamoeba histolytica no meio exterior, diz que seus cistos não vivem por muito tempo em fezes não diluídas, nas quais as bactérias putrefativas são muito ativas; que, entretanto, se as fezes forem diluídas por grandes quantidades d'água, de modo que a ação putrefativa se torne mínima, os cistos podem permanecer viáveis por vários meses. Acrescenta: "Assim, a sobrevivência do cisto da Endamoeba histolytica fora do corpo do hospedeiro, varia de poucos minutos até a três meses, ou possivelmente mais, dependendo principalmente das condições ambientes favoráveis ou desfavoráveis; isto constitui aspecto importante da epidemiologia da amebíase."

Hare (122), acerca da vitalidade dos cistos da Endamoeba histolytica, lembra que, sendo o mundo exterior seu ambiente natural no período de transição de um hospedeiro a outro, acham-se eles adaptados a resistir a exposição prolongada em condições exteriores. Afirma que podem sobreviver por 2 semanas pelo menos em fezes conservadas à temperatura ambiente e, em geladeira, por cerca de 2 meses, enquanto na água ou em cultura à temperatura ambiente, podem permanecer viáveis até 5 semanas; que temperaturas altas lhes são

porém, muito prejudiciais e matam-nos em curto tempo, sendo 50°C seu ponto térmico de morte; à temperatura de 37°C, não sobrevivem mais que poucos dias em fezes; a dessecação é rapidamente fatal aos cistos; em mãos contaminadas com fezes contendo cistos, morrem em 5 a 10 minutos após secarem as fezes e sob as unhas, nas mesmas condições, com 45 minutos.

A propósito do efeito de agentes químicos sobre os cistos, Hoare chama a atenção sobre sua grande resistência a vários deles e cita os exemplos da solução de permanganato de potássio a 2%, que não os mata, mesmo em contato de vários dias e do cloro, que, nas concentrações empregadas na purificação da água, não exerce nenhum efeito sobre eles.

Reverendo investigações anteriores sobre a resistência de cistos de protozoários intestinais no meio exterior, quando expostos à ação de agentes químicos, encontramos, entre as outras, as seguintes, de interesse.

Fantham e Porter,⁽⁴²⁾ conseguiram infectar gatinhos com cistos de Giardia intestinalis, conservados por 74 dias.

Boeck,⁽¹²⁾ em 1921, usando o critério de coloração pela solução aquosa de eosina como sinal de não viabilidade dos cistos, procurou estudar o efeito do calor sobre os mesmos. Primeiramente, determinou o ponto de morte térmica, dos cistos de várias espécies de protozoários parasitos do homem. O período de exposição à diferentes temperaturas foi de 5 minutos. Encontrou os seguintes valores: Endamoeba histolytica, 68°C; Endamoeba coli, 76°C; Iodamoeba butschii 64°C; Endolimax nana, 64°C; Giardia intestinalis, 64°C; e Chilomastix mesnili, 72°C.

Para os cistos da Endamoeba histolytica, pesquisou as percentagens médias de morte encontradas após a exposição de 5 minutos a várias temperaturas. Encontrou: a 48°, 24%; a 50°, 22%; a 52°, 24%; 54°, 44%; 56°, 62,2%; 58°, 75,4%; 60°, 84,2%; 62°, 90%; 64°, 94,8%; 66°, 97,2% e a 68° - 100%.

O mesmo autor (13), também, em 1921, estudou a longevidade de cistos em várias condições.

Ainda, pelo método da solução de eosina, acompanhado de obser

vações morfológicas, determinou a sobrevivência de cistos de diferentes espécies de protozoários intestinais humanos, em dois meios diferentes.

Imersos em água destilada, com temperaturas de 12 a 22°C e luz difusa, cistos de Endamoeba histolytica viáveis foram encontrados após 221 dias; de E.coli depois de 124 dias; de Giardia intestinalis após 32 dias e de Chilomastix mesnili, ao fim de 232 dias.

Em preparações úmidas, coradas por eosina, e fechadas com vaselina, cistos de Endamoeba histolytica ainda eram viáveis ao fim de 221 dias; de Endamoeba coli, 124 dias; Giardia intestinalis, 66 e Chilomastix mesnili, ao fim de 232 dias.

A longevidade dos cistos foi estudada, entretanto, em condições não naturais, após a lavagem repetida dos mesmos. Os cistos encontravam-se suspensos em água destilada, e em preparações de número reduzido de bactérias.

Boeck cita, nesse trabalho, Penfold, Woodcock e Drew que observaram cistos de Endamoeba histolytica vivos, por 15 dias, em água corrente; Thomson e Thomson que verificaram a presença de cistos vivos em fezes úmidas após 16 dias e Wenyon e O'Connor, após um mês.

Mills, Bartlett e Kessel, em 1925, em trabalho já referido (15), estudaram a resistência de cistos de vários protozoários intestinais a diferentes agentes desinfetantes, in vitro, e em vegetais contaminados com fezes contendo os cistos.

Usando ainda o critério de coloração pelo eosina como sinal de morte dos cistos, concluíram os autores que a água clorada, o álcool e o permanganato de potássio não eram satisfatórios na desinfecção de cistos existentes à superfície de vegetais. Verificaram também que a inflamação de álcool na superfície de frutas e hortaliças, assim como o derramamento de água fervente sobre elas, não destruiu todos os organismos, bactérias, cistos ou ovos de helmintos, pois o calor não atingia suficientemente todos os pontos.

Em 1926, Yorke e Adams (25) realizaram algumas observações sobre a longevidade de cistos da Endamoeba histolytica in vitro e sua resistência a vários produtos químicos.

Determinando a viabilidade dos cistos por meio de cultura,

obtiveram, em várias experiências, dados muito diferentes dos conseguidos por investigadores anteriores, que haviam usado o critério de coloração pela eosina. Assim, de acordo com seus resultados: a) os cistos de Endamoeba histolytica morrem muito rapidamente nos primeiros 3 ou 4 dias, em fezes guardadas em temperatura ambiente (16 a 20°C), e todos estão mortos dentro de cerca de 10 dias; praticamente, o mesmo aconteceria em fezes conservadas a 0°C; b) cistos lavados, mantidos em suspensão na água, sobrevivem por mais tempo, em especial a 0°C; mas mesmo neste caso, não vão além de 3 semanas; c) os cistos podem sobreviver a 45°C por 30 minutos, porém morrem dentro de 5 minutos à temperatura de 50°C; d) os cistos, resistem à exposição de 30 minutos a 20-25°C, ao ácido clorídrico a 5%, hidróxido de sódio a 1%, cloro a 20 p.p.m., permanganato de potássio a 1%, formaldeído a 0,2%, ácido carbólico a 0,5%, e ao lisol a 0,5%.

Dobell⁽³⁷⁾ encontrou sobrevida mais longa à temperatura ambiente. Pôde determinar que os cistos de Endamoeba histolytica, em temperatura igual ou inferior a 20°C, podem permanecer vivos até 37 dias; que à temperatura de 37°C, entretanto, morrem em poucos dias. Seus resultados foram determinados através do cultivo das amebas a partir dos cistos, pelo processo anteriormente desenvolvido por êle mesmo, em colaboração com Laidlaw.

Spector e Buky (181), em 1934, investigaram a viabilidade de cistos de Endamoeba histolytica e Endamoeba coli, expostos à dessecação natural nos dedos de voluntários. Os cistos da Endamoeba histolytica eram de fezes de casos de disenteria amebiana. As fezes, in natura emulsionadas, eram passadas sobre os dedos de voluntários e, a períodos variáveis após a contaminação, era colhido material para exame por lavagem. O material, após ser concentrado por centrifugação, era submetido ao teste da coloração pela eosina, para julgamento da viabilidade. Relataram os autores que, nas várias experiências realizadas, apesar da contaminação ser maior do que poderia ocorrer normalmente, após 5 minutos somente encontraram número muito pequeno de cistos viáveis da Endamoeba histolytica e, depois de 10 minutos, apenas excepcionalmente podiam encontrar algum cisto sobrevivente.

(122)

Spector, Baylis e Gullans, em 1934, estudaram a eficiência da filtração na remoção de cistos de Endamoeba histolytica da água, e do cloro, na destruição dos cistos dessa ameba e da Endamoeba coli. Concluíram: 1) os cistos da Endamoeba histolytica são removidos completamente da água por coagulação e filtração rápida em areia; 2) A quantidade de cloro ou cloramina requerida para matar os cistos de Endamoeba histolytica ou de Endamoeba coli, é muito maior do que poderia ser usada em suprimento público de água; o cloro é mais eficaz do que a cloramina na destruição dos cistos; 3) os cistos da Endamoeba coli não têm maior resistência ao cloro do que os cistos de Endamoeba histolytica.

Hamlin (73) examinou amostras dos esgotos de cinco estações de tratamento de Johannesburg, África do Sul. Encontrou, com frequência, cistos de Endamoeba histolytica e ovos de helmintos, nos esgotos gradeados e decantados, e nos efluentes de filtros biológicos, de tanque secundário de decantação e do tratamento por lodo ativado. Porém, não os encontrou nos efluentes dos filtros secundários de areia.

Baylis, Gullans e Spector (6) realizaram, em 1936, novas experiências sobre a remoção de cistos de Endamoeba histolytica pela filtração rápida em areia. Embora ainda levadas a efeito em condições de laboratório, as experiências, pelos cuidados de que se revestiram, poderiam ser tomadas como indicativas do que seria de se esperar na prática. O filtro usado tinha uma superfície de 10 pés quadrados e continha camada de 24 polegadas de areia, de tamanho efetivo de 0,5 mm. O número de cistos na água influente variou de 362 a 2.370 por galão. Um total de 114 galões de água filtrada foi examinado e somente 4 cistos foram encontrados. A redução percentual foi de mais de 99,99. Diante disso, os autores concluíram que a filtração realizada, igual à empregada extensivamente no tratamento da água, é realmente meio eficaz de remover cistos de Endamoeba histolytica da água.

(189)

Stone, em 1937, verificou que uma residual de cloro de 0,6 ppm em 60 minutos e de 1,6 em 15 minutos, destroem os cistos de Endamoeba histolytica suspensos em água, a 22-25°C, com 0,12 p.p.m. de nitrogênio orgânico, contendo cerca de 1500 cistos por ml. De seus estudos concluiu que cistos de Endamoeba histolytica e a Escherichia

coli pareciam igualmente suscetíveis, à cloração. Não referiu, entretanto, o número de Escherichia coli por ml nas suspensões usadas. Empregou hipoclorito de cálcio e cloro gasoso e não encontrou diferença na eficiência dos dois.

Gordon(64), em 1941, publicou os resultados de seus exames dos esgotos de Moscou, realizados repetidamente durante três anos, procurando cistos de protozoários. Encontrou cistos viáveis de Endamoeba histolytica, Endamoeba coli, Giardia Lamblia, Endolimax nana e Iodamoeba bütschlii.

Demonstrou também que o efluente final, após passagem por todas as fases de tratamento, ainda continha cistos viáveis, ao ser lançado no rio. Procurou estudar, então, o efeito sobre os cistos de vários fatores de importância na purificação dos esgotos. Pôde verificar que, nas condições experimentais, somente a filtração era capaz de remover completamente os cistos.

Chang e Fair (23), em estudo bem conduzido determinaram a sobrevivência de cistos da Endamoeba histolytica na água em várias temperaturas. A comprovação da morte dos cistos foi feita por cultura. Encontraram que, em água destilada estéril a 0°C, a sobrevivência se estende a cerca de 3 meses (87,5 dias) e que se reduz a terça parte, a cada aumento de 10°C. Assim, a sobrevivência a 10°C é de cerca de um mês (28,5 dias); a 20°C, cerca de 10 dias; a 30°C, cerca de 3 dias e a 40°C, apenas 1 dia. Não conseguiram evidência de que a sobrevivência pudesse ser diferente em águas superficiais naturais e em esgotos. Entre pH 6,5 e 7,1, não notaram efeito significativo da concentração hidrogeniônica sobre a viabilidade dos cistos.

Verificaram também, cuidadosamente, a ação do cloro sobre os cistos e concluíram que a concentração de cloro gasoso necessária para destruí-los, parecia estar perfeitamente dentro dos limites inferiores da supercloração, contanto que o período de contato fôsse de pelo menos 30 minutos. Estudaram o efeito de variáveis intervenientes, como temperatura, pH, nitrogênio orgânico e densidade dos cistos.

Suas conclusões foram: A quantidade de cloro para efeito cisticida parece ser afetada, aproximadamente, da seguinte maneira: (1) Reduz-se à metade, pela elevação de 20° F na temperatura da água; (2)

decreça de 25 por cento, com aumento de 100% no tempo de contato; (3) eleva-se de 25%, quando se duplica a densidade de cistos; (4) reduz-se à metade, quando se baixa o pH de 7 para 6, e aumenta de cerca de 25%, quando se o eleva para 9. A morte dos bacilos coliformes precede a dos cistos.

Brady, Jones e Newton⁽¹⁴⁾, em estudos de laboratório, cuidadosamente controlados, demonstraram, em 1943, que a hipocloração por 15 minutos, com 3.77 mgm de hipoclorito de cálcio por litro d'água, não era suficiente para impedir garantidamente a transmissão da amebíase pela água de beber; que entretanto, usando 7,54 mg por litro, durante 20 minutos ou mais, praticamente todos os cistos eram mortos.

Kessel, Allison, Kaine, Queiros e Gloeckner, (99), em 1944, compararam os efeitos cisticidas do cloro e do ozônio, empregando suspensões de 100 cistos por ml acompanhados do número correspondente de bactérias presentes na cultura (Escherichia coli, Alkaligenes fecalis e um estreptococograma), o qual era de 500.000 a 1 milhão.

A comparação foi realizada em temperatura de 27° C, vários pH, de 5 a 9, com residuais de cloro de 0,5 a 1,0 ppm e residual de ozônio de 0,3 ppm. Verificaram ação muito maior do ozônio. Assim, os tempos requeridos pelo ozônio, em residual de 0,3 ppm, para a morte das bactérias e dos cistos, foram várias vezes menores que os requeridos pelo cloro, em residuais de 0,5 ou 1 ppm. Os autores também verificaram que o ozônio sofria menos a influência do pH que o cloro e que o cloro gasoso em residual de 0,5 ppm era mais ativo que igual residual produzido pelo hipoclorito de cálcio. Afirmam não terem podido notar, nas condições da experiência, diferenças grandes entre os efeitos bactericida e cisticida. Eles mesmo, lembraram, porém, que o número de bactérias era muito maior que o de cistos.

Newton e Jones⁽¹⁴³⁾, em 1949, estudaram o efeito do ozônio sobre os cistos da Endameba histolytica. Concluíram que esse agente em solução aquosa é altamente cisticida e que sua ação não parece ser muito influenciada por pH, temperatura ou nitrogênio orgânico. Em suas experiências, foi evidenciada a morte, de 97 a mais de 99 por cento dos cistos, após exposição de 1 minuto, a concentrações de ozônio de 0,5 ppm ou mais.

Beaver e Deschamps(10), em 1949, puderam demonstrar, através de culturas, a viabilidade de cistos de Endamoeba histolytica expostos no solo até 8 dias e, em água limpa, até 4 dias, As experiências foram realizadas em temperatura de 28 a 34° C.

Beaver e Deschamps⁽¹¹⁾, no mesmo ano, realizaram estudos sobre o efeito do ácido acético sobre a viabilidade dos cistos de Endamoeba histolytica. As experiências foram realizadas in vitro, com cistos repetidamente lavados, e a verificação de sua viabilidade foi realizada através de cultura. Puderam notar que a imersão contínua em ácido acético a 5%, provocava a morte dos cistos em 10 a 15 minutos. Empregando vinagre, com cerca de 6% de ácido acético, em duas das quatro provas realizadas com 15 minutos de contato, e encontraram sobrevivência de cistos em uma das duas levadas a efeito com exposição de 20 minutos.

Foi verificado também que, em exposições até de 1 hora, o ácido cítrico até 20% e o ácido clorídrico N/2 não destruiu todos os cistos. Os autores afirmaram, por outro lado, que a imersão em ácido acético a 5%, até por 30 minutos, não prejudicava o sabor e aparência da maioria das verduras frescas. Concluíram que o ácido acético seria o agente cisticida ideal na desinfecção de frutas e verduras.

Deve ser observado, é óbvio, que essas experiências, efetuadas in vitro, com cistos lavados, não autorizavam nenhuma conclusão sobre a eficiência do ácido acético na desinfecção dos vegetais em condições naturais.

HELMINTOS: Yoshida (216), em 1949 investigou a capacidade de resistência dos ovos de Ascaris lumbricoides a vários agentes químicos, em vários tempos. A fim de ilustrar a elevada resistência dos ovos desse helmintho, serão citados alguns dos seus resultados. Conservando fezes à temperatura ambiente por 10 dias em cada reagente e, em seguida, separando os ovos e colocando-os novamente em igual concentração do composto químico, a 31° C, pôde observar que a maioria ainda estava viva, após 52 dias em ácidos nítrico a 0,5%, clorídrico a 5%, e acético a 7%, assim como em formalina a 10%.

Após imersão das fezes em cada um dos reagentes, por 4 a 5 horas, separação dos ovos e sua exposição novamente a igual concentração do composto experimentado, observou a sobrevivência da maioria, após 49 dias em ácido nítrico a 1% e clorídrico a 10%, após 42 dias em ácido nítrico a 1,5%, sublimado corrosivo a 1%, e permanganato de potássio a 0,5%. Deixando as fezes no reagente por 8 dias, separando os ovos e mantendo-os em água a 31° C, observou, 34 dias depois, a sobrevivência da maioria dos que haviam sido expostos ao sublimado corrosivo a 1% e aos ácidos nítrico a 1,5%, acético a 12,5% e clorídrico a 15%. Submetendo as fezes, por 14 dias, ao agente químico, separando os ovos e mantendo-os em água, pôde comprovar 18 dias depois, que estava viva a maioria dos expostos à formalina a 20% e aos ácidos sulfúrico a 10%, acético a 12,5% e clorídrico a 20%.

Stiles (186), em 1927, verificou o efeito do hidróxido de sódio, do sulfato de cobre e da fermentação natural sobre ovos de Necator americanus e Ascaris lumbricoides.

Relatou que, à temperatura de verão, ovos do necator, em fezes, eram mortos numa solução de hidróxido de sódio a 1%, dentro de 14 dias; solução a 2% matava-os dentro de 9 dias; a 5%, em 6 dias; a 0,5% somente dentro de 4 semanas. A fermentação natural das fezes em presen-

ça de unidade suficiente, provocava o mesmo resultado somente em cerca de 5 meses.

Em relação aos ovos de Ascaris, êsses tempos não foram suficientes para a morte total.

O tipo de solo exerce grande influência sobre a viabilidade e o desenvolvimento de ovos de Ascaris e Trichocephalus Brown, no Panamá, em 1927, pôde demonstrar que ovos de Ascaris, em fezes depositadas na areia exposta ao sol, degeneravam-se em 21 dias. Na sombra, porém, ao fim de 35 dias, 91% dos ovos continham embriões móveis. Em 54 dias, essa percentagem caía a 69%.

Em argila, greda e solo rico de humo, os ovos desenvolveram-se, mesmo quando em terreno exposto ao sol. Em greda, ao fim de 3 semanas, 54% dos ovos haviam se desenvolvido e em argila, 71%. À sombra, entretanto, o desenvolvimento dava em percentagens mais elevadas.

Caldwell e Caldwell (22), de suas observações sobre o desenvolvimento de ovos de Ascaris humano e do porco, em condições naturais, concluíram, em 1928, que, isoladamente, o fator de ação mais prejudicial ao desenvolvimento dos ovos de Ascaris é a dessecação, e que todos os agentes físicos naturais, como temperatura, umidade, exposição ao sol ou sombra, etc., são de importância, na grande maioria dos casos em condições normais, apressando ou retardando a desidratação dos ovos.

Otto (148), em 1929, observou, entre outros fatos, que ovos de Ascaris humano, à sombra, desenvolveram-se e permaneceram vivos, através de todos os meses do verão, na superfície de quatro tipos de solos diferentes; ao sol, verificou que, após 160 dias cerca de 25% dos ovos, em terreno argiloso, greda e areia, ainda estavam vivos e somente aqueles colocados em cinzas morreram antes de se embriarem, o que atribuiu às mais altas temperaturas atingidas pela camada de cinzas.

À propósito do efeito da temperatura, citou, entre muitos o trabalho de Zavodovsky e Sidorov (217), o qual comprovaria serem os ovos de Ascaris lumbricoides capazes de se desenvolver entre 7 - 8°C e 36 - 38°C. Cita as investigações de Wharton (205), de Ohba (146) e de Ogata (147), que verificaram serem os ovos mortos somente a temperaturas muito maiores, pois são capazes de resistir a mais de 45 minutos a 50°C, embora a 70°C morram em poucos segundos.

Otto discutiu também os efeitos da dessecação sobre os ovos, citando várias investigações sobre esse ponto, inclusive sobre sua interrelação com o tipo de terreno. Embora a desidratação seja, dos fatores normais o que mais deva influir sobre a capacidade de desenvolvimento dos ovos, resulta de todos os estudos a noção nítida da grande capacidade de sobreviver a condições extremas e de poder continuar seu desenvolvimento em circunstâncias mais favoráveis.

Holf, (145), em 1932, estudou comparativamente o efeito de alguns fatores sobre ovos de Trichocephalus trichiuris e de Ascaris lubricoides.

Em experiências a que procurou dar caráter quantitativo, determinando as percentagens de ovos das duas espécies, que se embrionaram após exposição a quatro tempos diferentes, a temperaturas que variavam de 50 a 60° C, comprovou a maior sensibilidade dos ovos de Trichocephalus a temperaturas elevadas.

Assim, tomando um exemplo extremo, verificou a sobrevi-vência de 50% dos ovos de Ascaris e de nenhum ovo de Trichocephalus após 5 minutos a 52° C. Entretanto, a diferença não é tão manifesta quando submetidos a menores quantidades de calor. Após 1 minuto a 54° C, a percentagem de ovos viáveis de Ascaris e de Trichocephalus reduziu-se a 26 e 14%, respectivamente.

Holf confirmou a necessidade dos ovos de Trichocephalus de maior teor de unidade para seu desenvolvimento, e, também, sua maior sensibilidade à dessecação. Em relação à radiação ultra-violeta, os ovos de Ascaris, entretanto, se mostraram mais sensíveis.

Hirst (81), em 1932, encontrou até 250 ovos de ancilostomídeos por grama de sedimento nos coletores principais de uma rede de esgotos, em Ceilão. Larvas não eram frequentes. Lodo de tanque séptico, em média, apresentava 28 ovos de ancilostomídeos por grama, além de ovos de Ascaris. Por litro de esgoto, encontrou ^{até} 330 ovos. Na pequena estação de tratamento com três tanques Inhoff em série, o efluente final continha 30 ovos por litro (15.500 por litro no influente), tendo o primeiro tanque removido mais de 98 por cento.

Winfield e Chin (210), em 1938, investigando doenças transmitidas por fezes na China, acharam que a contaminação direta do am

biente, e não as verduras, constituia o fator crítico da disseminação de Ascaris lumbricoides.

Vassilkova, ⁽²⁰¹⁾ em 1940, investigou a viabilidade dos ovos de Ascaris, depositados com fezes em fossas, a fim de determinar o tempo necessário para se poder usar, com segurança, excreta humano na adubação de hortas. Uma fossa foi deixada aberta e três foram tapadas com tábcas e recobertas de terra. Uma vez por mês, de cada uma, retirava amostras que eram colocadas em condições propícias ao desenvolvimento dos ovos e mantidas em observação por cinco meses.

Na fossa aberta todos os ovos pareceram em 6 meses. Nas outras, em 6 a 8 meses morreram 97%, e 10 a 13 meses foram necessários para a destruição de 100%.

Demonstrou ainda que em fezes diluídas com igual volume de água os ovos morriam somente após 20 meses.

Vassilkova ⁽²⁰⁰⁾, em 1940, estudando o problema da possível utilização de esgotos nas hortas de Moscow, procurou avaliar o grau de contaminação por ovos de helmintos, acarretado por diferentes métodos de cultivo. Verificou que a média por litro de esgoto era de 19 ovos, de várias espécies de helmintos. No solo irrigado com esgotos foram encontrados ovos de sete espécies diferentes e seu número foi de 97 em 5.600 g. A contaminação dos vegetais, cultivados de diversas maneiras, expressa em número de ovos por 100 espécimes de vegetais, foi: abobrinha, 5 a 7; tomates, 2,8 a 16 e cenouras, 2. De todos os ovos obtidos dos vegetais, somente os de Ascaris, os quais representavam 36% do total, eram viáveis.

Wright, Cram e Nolan, ⁽²¹³⁾ em 1942, examinaram amostras de lodo de esgoto de municípios e estabelecimentos militares americanos. Em 75 amostras dos últimos, foram encontrados 25 ovos de helmintos, a maioria de Ascaris lumbricoides, Trichocephalus trichiuris e Hymenolepis sp. Como era de esperar, os ovos foram encontrados principalmente no lodo dos esgotos, porém, foi possível encontrá-los também nos esgotos brutos.

Verificaram a viabilidade de ovos em lodo até com 60 dias de secagem em leitos de areia.

Chang e Ch'in (24), em 1943, na China, pesquisaram a presença de ovos de Ascaris lumbricoides em 373 amostras de conservas (pickles) de hortaliças, comerciais ou feitas em casa. Os vegetais utilizados em seu preparo eram provenientes de solo fertilizado com escreta humano, como de costume na região. Encontraram 7,14 por cento de amostras positivas. Aparentemente a maioria dos ovos era viável.

Os autores estudaram a viabilidade de ovos de Ascaris em salmoura igual à utilizada nas conservas. Puderam verificar que proporção considerável dos ovos, conservados na salmoura, à temperatura ambiente, por 30 dias, continuava viável, qualquer que fôsse sua fase original, embrionada ou não. Concluíram que, embora houvesse nas comunidades rurais fontes mais importantes de infestação, as conservas também tinham parte na disseminação do Ascaris lumbricoides.

Chang e Ch'in referiram, outrossim, ter encontrado 17,5 por cento das hortaliças vendidas nos mercados de Chengtu, contaminadas com ovos de Ascaris lumbricoides.

Cram (31), em 1943, investigou a capacidade removedora de ovos de helmintos e cistos de protozoários, de vários processos de tratamento de esgotos. Verificou que a decantação primária não removevia parte considerável dos cistos da Endamoeba histolytica e, embora fôsse capaz de remover ovos de Ascaris e de ancilostomídeos com muito maior eficiência, não o fazia completamente. Também foi verificada a passagem de ovos através de filtros biológicos e tratamento pelo lodo ativado. O único processo capaz de remover totalmente, tanto ovos como cistos, foi o de filtração intermitente em areia.

Na digestão do lodo a 20 - 30° C, após 3 meses, a viabilidade dos ovos de Ascaris era pouco afetada, e após 6 meses ainda 10% eram viáveis. Ovos de ancilostomídeos sobreviveram à digestão por períodos mais curtos: 64 dias a 20° C e 41 a 30° C. Cistos de Endamoeba histolytica permaneceram viáveis por 12 dias a 20° C e 10 dias a 30° C.

Ovos de ascarídeos eram viáveis após 170 dias no lodo em secagem, ao ar livre. Eram viáveis em lodo com menos de 10% de umidade mas não com menos de 4%, e a conclusão foi de que a secagem co

num do lodo não destrói completamente os ovos dos ascarídeos.

Ovos de ancilostomídeos eclodiram no lodo em secagem e as larvas permaneceram vivas por 62 dias, ou até que a unidade Gaisse a 10%. Assim, a secagem do lodo pode deixar de matar também os ovos desses helmintos.

Newton, Bennett e Figgat (144), em 1949, estudaram o efeito de vários processos de tratamento de esgotos sobre ovos de Taenia saginata.

Suas observações, realizadas em modelos de laboratório, mostraram que mesmo sob condições ótimas de sedimentação, uma percentagem dos ovos escaparia no efluente; a filtração em areia é processo de grande eficiência na remoção dos ovos do efluente primário, pois com a areia de 0,5 mm de tamanho efetivo, em coluna de 30 cm de altura, a uma taxa rápida de filtração de 1.000.000 de galões por acre, por dia, e com influentes contendo 20.000 a 73.000 ovos por litro, apenas numa das experiências, a remoção dos ovos não foi total; os processos de digestão de lodo são muito lentos na destruição dos ovos, pois ovos aparentemente normais foram recuperados após 6 meses de digestão a 24 - 29° C; 30 a 38% dos ovos do influente foram recuperados em modelos de filtros biológicos, trabalhando a taxas reduzidas; o processo do lodo ativado também exerce pequeno efeito sobre os ovos da Taenia.

Wang e Dunlop (145), em 1954, realizaram investigação sobre a incidência de parasitos animais em esgotos e águas de irrigação contaminadas pelos esgotos, e em vegetais irrigados com essas águas. Também fizeram estudos sobre o efeito do tratamento primário dos esgotos, seguido de cloração, na remoção desses organismos dos esgotos brutos. Este estudo, realizado com amostras colhidas na estação de tratamento de Denver, indicaram que cerca de 20 por cento dos ovos de Ascaris e 46 por cento dos cistos de Endamoeba coli, encontrados nos esgotos brutos, estavam presentes no efluente final. A remoção de bactérias coliformes e de enterococos, no entanto, foi de mais de 99 por cento.

Ovos de ancilostomídeos, Trichocephalus e Taenia, também foram encontrados no efluente.

Após o efluente ser lançado ao rio, ao alcançar um canal de irrigação, o número médio de ovos e cistos se achava muito reduzido, sendo de apenas 1,1 ovo e 3,6 cistos por litro, na altura da primeira plantação de hortaliças. Na água do canal, havia cêrca de 210.000 a 640.000 coliformes por ovo de Ascaris, 64.000 a 200.000 coliformes por cisto de Endamoeba coli e 10 a 30 per enterococo.

A percentagem de ovos viáveis de Ascaris variou de 81 a 87 por cento, nas várias amostras colhidas dos esgotos brutos, decantados ou clorados, assim como nas do rio e do canal de irrigação.

Entre as hortaliças, uma amostra de alface e uma de repolho, dentre 3 amostras de aipo, alface e repolho, colhidas em período em que os esgotos não estavam sendo tratados, revelaram a presença de ovos de Ascaris. De 15 amostras das mesmas verduras, colhidas quando a estação de tratamento estava funcionando, nenhuma foi positiva.

Da revisão da literatura sôbre helmintos intestinais, Rudolfs, Falk e Rogotzkie, concluíram:

1) Os ovos d'esses vermes apresentam no solo, lodo de esgotos e nas excreta, resistência considerável que depende das condições externas.

2) Os ovos do gênero Ascaris são os mais resistentes, não só a produtos químicos e desinfetantes, como também às condições do ambiente.

3) A sobrevivência no solo e no lodo, depende da manutenção de certo grau mínimo de umidade e de temperatura abaixo de ponto tórmico total. Em temperaturas muito baixas há sobrevida, porém, retarda-se o desenvolvimento.

4) O tipo de solo e o grau de insolação determinam, em grande parte, as condições de umidade e de temperatura, de modo que afetam grandemente a sobrevivência dos ovos.

5) Vegetais cultivados em solo contaminado por esgotos ou excreta podem ser fonte de infestações, porém, o grau da disseminação de helmintos, provocada por essa via, nunca foi claramente demonstrado.

6) Excreta ou lodo de esgotos armazenados, podem conter

ovos viáveis por vários meses. Submetidos a processo de "composting" por período suficiente, podem se transformar em produto útil e livre de risco.

7) É necessário tratamento muito completo de esgotos para remover completamente os ovos de helmintos do efluente.

P A R T E II

Capitulo I

TÉCNICAS BACTERIOLÓGICAS

I - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE BACTÉRIAS COLIFORMES

Foram utilizados, com pequenas variantes, métodos padrões adotados, para exame da água pela "American Public Health Association". Nesses métodos, empregamos os seguintes meios de cultura, cuja descrição pode ser encontrada nos referidos métodos (22): 1) Caldo lactosado (CL); 2) Caldo lactose-bile verde-brilhante (LBVB); 3) Agar-eosina azul de metileno (EAM); 4) agar simples (A).

Três fases podem ser distinguidas no processo para determinação de coliformes, constituindo 3 tipos de provas: prova de presunção, prova de confirmação e prova completa.

A prova de presunção consiste na inoculação do material a ser examinado em tubos de caldo lactosado contendo pequenos tubos invertidos para coleta de gás. Quando há formação de gás após incubação a 37° C durante 24 a 48 horas, a prova é considerada positiva. Em todas as nossas experiências, porém, uma vez completadas 24 horas de incubação, passamos logo à prova de confirmação, independentemente da presença ou ausência de gás. Dessa forma, usamos os tubos de caldo lactosado apenas como meio de enriquecimento e não como indicadores presuntivos da presença de coliformes.

Para a prova de confirmação, uma alça de cultura dos tubos de enriquecimento era semeada em meio seletivo, seja EAM em placas, seja LBVB em tubos contendo tubinhos invertidos. A prova de confirmação é considerada positiva quer quando se verifica produção de gás nos tubos de LBVB, quer quando, nas placas de EAM, se formam colônias típicas de coliformes, as quais são escuras, de aparência nucleada, às vezes com brilho metálico. O resultado dessa prova é considerado duvidoso quando, nas placas de EAM se formam colônias atípicas, não nucleadas, opacas, róseas. Nos outros casos o resultado é negativo. Na nossa experiência, o aspecto das colônias nas placas de EAM, com frequência demasiada, não se mostrou caracterís-

co merecedor de confiança para a identificação de bactérias coliformes. As colônias dessas bactérias, tomavam, frequentemente, aspecto completamente atípico, além do que, por vezes, colônias com aspecto bastante típico das de coliformes, revelavam-se constituídas por outras bactérias.

A prova completa foi sempre realizada a partir de 2 colônias de cada placa de EAM, procurando-se escolher colônias cujo aspecto se aproximasse daquele considerado como típico. Cada colônia foi inoculada em caldo lactosado e em agar simples. Após 24 horas de incubação, de todas as culturas em agar, faziam-se esfregãos corados pelo método de Gram. Os tubos de caldo lactosado eram mantidos em incubador durante 48 horas, após o que era observada a presença ou ausência de gás no tubinho invertido. A presença de bacilos gram-negativos não esporulados na cultura em agar proveniente de pelo menos uma das colônias, aliada à produção de gás na cultura em caldo proveniente da mesma colônia, constituía uma prova completa positiva para a cultura inoculada na placa de EAM correspondente, originária de um dos tubos de enriquecimento.

Para a avaliação do número de coliformes presentes num dado material, líquido ou em suspensão, são examinadas várias replicatas de diferentes volumes desse material. Nas experiências consideradas no presente estudo foram examinados, de cada material, 5 ou 6 volumes decrescentes em razão decimal, usando-se 3 ou 4 replicatas de cada volume. Volumes de 10 ou 1 ml eram medidos diretamente com pipetas da respectiva capacidade. Volumes menores eram obtidos tomando-se, com pipetas de 1 ml, esse volume da diluição apropriada, feita em água tamponada de pH 7,2 (231). Cada replicata era inoculada num tubo de caldo lactosado para enriquecimento, fornecendo, ao final das provas acima descritas, um resultado positivo ou negativo, quanto à presença de coliformes. Conforme o número de replicatas positivas obtidas para cada volume, procedia-se à seleção de 3 "volumes críticos", em relação aos quais era calculado o "número mais provável" para o material examinado.

O número mais provável (NMP), que representa uma estima

tiva da densidade de microrganismos e depende da combinação dos resultados obtidos para os diversos volumes, decorre de teoria estatística desenvolvida originalmente por McCrary () e apresenta apreciáveis vantagens para tratamento estatístico (). Para essa estimativa, foram, no presente estudo, utilizadas as tabelas de Hoskins (). Em casos especiais, o número mais provável foi determinado pela tabela de Stevens () que dispensa a seleção de volumes críticos, permitindo a utilização de todos os resultados observados. Em trabalho anterior, o autor apresentou a literatura mais importante sobre o N.M.P. ().

II - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ESCHERICHIA COLI

Dois processos foram utilizados para caracterizar a presença da Escherichia coli.

O primeiro processo partia dos coliformes para os quais fôra positiva a prova completa descrita precedentemente. Consistia em submeter êsses germes às provas de Voges-Proskauer e do citrato de sódio, realizados conforme os métodos padrões da "American Public Health Association" para exame de água.

Alguns dêsses coliformes provinham de colônias cujos característicos morfológicos, nas placas de EAM, correspondiam aos que têm sido descritos como típicos de Escherichia coli (225) (227) (229), pelo que foram considerados separadamente.

O segundo processo consistia na inoculação, em caldo-lactose-ácido bórico (LAB), de uma gota da cultura do material original em caldo lactosado, aqui também utilizado apenas como meio de enriquecimento durante 24 horas. O meio LAB, desenvolvido por Vaughn e Levine (231) (235), quando incubado a $43 \pm 0,5^{\circ} \text{C}$, é impediante para as bactérias coliformes à exceção de Escherichia coli, cuja presença se revela, segundo os mesmos autôres, pela produção de gás dentro de 48 horas. Uma vez que êsse processo de determinação de Escherichia coli anteriormente só fôra utilizado para o exame de água, procedemos a uma investigação da especificidade do mesmo para

A pesquisa de Escherichia coli em alface. Nas experiências em que se utilizou a cultura em meio LAB, era a mesma semeada numa placa de EAM sempre que havia produção de gás. Para colônias isoladas dessa placa, realizava-se a prova completa de determinação de coliformes, conforme descrita na secção precedente, e, em seguida, a identificação de Escherichia coli pelo primeiro processo acima. Nessas experiências, quando nas culturas de LAB havia produção de gás após 24 horas, procedia-se imediatamente à semeadura nas placas de EAM; os tubos de LAB negativos eram mantidos em incubação até o final do período de 48 horas, quando então eram passadas para as placas de EAM as culturas que desenvolveram gás no segundo dia.

Conforme resultados que serão apresentados, nas experiências que acabam de ser referidas evidenciou-se: por um lado, uma confirmação muito nítida, com o material por nós estudado, da especificidade do meio LAB para a determinação de Escherichia coli; por outro lado, a menor conveniência de incubação em LAB durante 48 horas, uma vez que os resultados provenientes dos exames de tubos dêsse meio que desenvolveram gás após 24 horas mostraram-se mais fidedignos que os obtidos com material incubado durante mais tempo. Consequentemente na parte das experiências do presente estudo relativas a métodos de tratamento, o segundo processo usado para determinar Escherichia coli incluiu simplesmente a verificação da produção de gás no meio LAB após 24 horas de incubação a 43° C. Para a estimativa do número de Escherichia coli presente em cada material estudado foram examinados 3 ou 4 replicatas de 5 volumes seriados com razão decimal e, a partir dos resultados das replicatas, obtido o NMP correspondente, conforme descrito na secção precedente.

III - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ENTEROCOCCOS

Para a determinação do número mais provável de enterococos presente em cada material estudado, 3 replicatas de 5 volumes seriados em razão decimal eram examinadas pelo método de Litsky, Mallmann e Fifield, suplementado conforme descrito a seguir.

Inicialmente, eram inoculados tubos de caldo dextrose azida (DA), os quais eram incubados a 37° C durante 48 horas. Quando, ao fim desse período, aparecia turvação no meio de cultura, considerava-se positiva a prova de presunção para enterococos. Para confirmação, inóculos grandes da cultura em DA eram transferidos para tubos de caldo azida etil-violeta (AEV), os quais eram também incubados a 37° C durante 48 horas. A turvação dos tubos de AEV, que às vezes se acompanhava da formação de pequeno disco de depósito de cor violeta, constituía prova de confirmação positiva.

Em aditamento às provas precedentes, material de cada tubo de AEV era submetido a exame microscópico em esfregaço corado pelo método de Gram e inoculado num tubo de caldo simples com 6,5% de cloreto de sódio. A presença de enterococos era admitida somente nos casos em que o exame microscópico revelava cultura aparentemente pura de enterococos, associada a crescimento no tubo de caldo com teor elevado de cloreto de sódio.

IV - PESQUISA DE SALMONELAS

Como processo de enriquecimento, 150 ml do material em estudo eram inoculados em 2 frascos contendo cada um 150 ml de caldo tetracionato verde brilhante. Este meio era preparado em concentração 3,3 vezes maior que a preconizada na fórmula adotada por Kauffmann (), a fim de compensar a diluição acarretada pelo volume grande de água no inóculo. Dessa forma, reduzia-se a pouco menos de metade o volume total da cultura para um mesmo volume de inóculo.

Após incubação a 37° C durante 18 horas, material de cada frasco era passado para 2 placas de cada um dos seguintes meios: 1) SS; 2) EAM; 3) Agar-verde brilhante (AVB).

De cada uma dessas placas, após incubação a 37° C durante 24 horas, selecionavam-se 5 a 6 colônias, que eram passadas para meio de agar ácido rosólico. Caso as culturas neste meio, após 24 horas de incubação a 37° C, não evidenciassem fermentação

da lactose, eram inoculadas em tubos de meio de Krumwiede. Após incubação durante 24 horas a 37° C, as culturas que nesses tubos, denotavam o tipo fermentativo de Salmonella ou Shigella eram submetidas a provas bioquímicas.

As cêpas com característicos bioquímicos do gênero Salmonella foram então submetidos a prova de aglutinação com sôro polivalente, flagelar e somático. A identificação ulterior das cêpas com as quais se observou aglutinação, bem como a identificação das culturas que apresentaram os característicos bioquímicos de Shigella, foi levada a efeito no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Capítulo II

EFICIÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA ALFACE

I - COMPARAÇÃO MEDIANTE A DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE COLIFORMES.

a) Métodos - Dois métodos foram estudados, um dos quais utilizava a água de lavagem das folhas e, o outro, uma suspensão aquosa e homogênea de folhas trituradas em liquidificador de alta velocidade.

No primeiro método, as folhas de alface, não lavadas, eram pesadas e colocadas em frascos estéreis, cujas tampas, providas de guarnição de borracha, permitiam fechamento hermético. Volumes de água destilada esterilizada correspondentes a 5 vezes os pesos das folhas de alface eram acrescentados. Cada frasco, depois de fechado, mantido em posição vertical, era submetido a agitação violenta em movimentos para cima e para baixo, repetidos 100 vezes. A água de lavagem resultante adquiria coloração verde bastante acentuada e era carregada de detritos provenientes das folhas, as quais se apresentavam intensamente maceradas.

No segundo método, folhas de alface também não lavadas, depois de pesadas, eram colocadas em liquidificador esterilizado. Juntava-se volume de água destilada esterilizada igual ao peso das folhas. Quando todas as folhas entravam no processo de trituração, o aparelho era levado à sua velocidade máxima, a qual era mantida durante 5 minutos.

Tanto no primeiro como no segundo método, retiravam-se com pipetas estéreis os volumes necessários ao exame bacteriológico quantitativo. No primeiro método, o resultado obtido para a unidade de volume da água de lavagem era multiplicado por 5 para referência à unidade de peso das folhas.

No caso do material liquidificado, os volumes eram me-

dados com o aparelho ainda em funcionamento, para garantia da homogeneidade; assim incluíam, necessariamente, uma certa quantidade de ar. Uma vez que o peso dessa quantidade de ar era praticamente desprezível, os resultados relativos às porções medidas dessa forma passaram a ser expressos não em relação à unidade de volume, mas ao correspondente peso de fôlhas. Uma verificação preliminar havia indicado que a variação de densidade do material liquidificado era bastante pequena, de modo a não introduzir erro apreciável nas medidas. Nessa verificação, foram feitas passagens de 250 porções de 1 ml, retiradas de 10 lotes diferentes de material liquidificado; para cada lote repetiu-se a pesagem com 5 pipetas, cada uma das quais serviu para 5 medições. Foram as seguintes as médias do peso em gramas de 1 ml de material liquidificado (água e fôlhas em partes iguais por peso) para as 25 observações correspondentes a cada um dos 10 lotes:

Lote:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Média:	0,81	0,79	0,76	0,77	0,79	0,79	0,78	0,77	0,78	0,80

O coeficiente de variação dessas médias é apenas cerca de 2 por cento, o que justifica considerar-se a média global, 0,783, como razoavelmente fidedigna. Contendo o material liquidificado pesos iguais de água e de fôlhas, adotou-se então o valor 0,39 g como o peso de fôlhas contido em 1 ml desse material. Por isso, neste segundo método, o resultado obtido para a unidade de volume do liquidificado era multiplicado por 2,56, para referência à unidade de peso das fôlhas.

Quarenta e seis lotes, constituídos de 3 pés de alface cada um, foram submetidos a exame pelos dois métodos. Para cada lote tomavam-se, com cuidados de assepsia, 20 fôlhas de cada pé de alface. Estas fôlhas, as 20 mais externas após se desprezarem as fôlhas dilaceradas ou deterioradas, à medida que iam sendo retiradas, eram distribuídas, alternadamente, uma para cada método de exame. O material submetido a cada tratamento era, assim, constituído de 30

fôlhas de cada lote.

Examinaram-se 4 ou 5 lotes por dia e em dias sucessivos iniciava-se a distribuição das fôlhas alternadamente para um ou outro método.

Tanto a água de lavagem como o material liquidificado foram examinados pela prova completa de determinação dos microrganismos coliformes, realizada através do emprêgo de placas de EAM na prova de confirmação. Cada um dos materiais provenientes de cada lote, foi submetido a 2 exames, a partir de duas séries diferentes de diluições. Em cada exame inocularam-se 3 replicatas de cada um de 6 volumes decrescentes com razão decimal, partindo de 0,1 ml. A realização dos exames em duplicata permite análise estatística destinada a medir o erro de cada método e, dada a variabilidade dos números estimados de bactérias, oferece a vantagem do seu valor médio ter maior probabilidade de se aproximar do verdadeiro valor do que ocorreria fazendo-se um único exame.

b) Resultados - A prova completa da determinação das bactérias coliformes, como realizada nesta experiência, foi dificultada pelos resultados não satisfatórios da confirmação em placas E.A.M. A freqüência desusada de placas onde não se evidenciavam colônias características foi notada já entre as 238 placas semeadas no primeiro dia de exame, correspondentes aos 4 primeiros lotes examinados. Tal fato levou à decisão de sempre se submeter germes de duas colônias de cada placa à prova completa. Quando não se encontravam colônias características, sempre se procurava escolher as colônias de aspecto mais aproximado ao das descritas como típicas.

O Quadro I apresenta os resultados obtidos para cada exame: número de replicatas positivas para cada volume e o correspondente número estimado de coliformes por 1 g de fôlhas de alface.

Pode-se observar a freqüência demasiada de séries irregulares de resultados. Tal ocorrência tornou impossível a seleção dos três volumes críticos para a consulta do N.M.P. nas tabelas de Hoskins. Por esse motivo utilizou-se a tabela de Stevens, já referida, a qual permite a consideração de todos os resultados.

QUADRO I

Resultados da determinação do número dos coliformes obtidos por liquidação e por "lavagem" em diferentes lotes de alface.

Lote	Método*	Número de replicatas positivas para cada volume						Nº estimado de coliformes por 1 g de fôlhas
		-1 10 ml	-2 10 ml	-3 10 ml	-4 10 ml	-5 10 ml	-6 10 ml	
1	Lq.	3	3	3	3	3	0	461 400
		3	3	3	2	2	0	97 730
	Lv.	3	3	3	1	0	0	19 020
		3	3	2	2	0	0	19 020
2	Lq.	3	2	3	3	3	0	223 900
		3	3	3	2	3	1	461 400
	Lv.	3	3	3	1	0	0	19 020
		3	3	3	1	1	0	42 760
3	Lq.	3	3	3	3	0	0	44 370
		3	3	3	3	1	0	97 730
	Lv.	3	3	1	2	2	0	42 760
		3	3	2	0	0	0	4 276
4	Lq.	3	3	1	0	0	0	973
		3	2	2	2	2	1	44 370
	Lv.	3	3	1	2	0	0	8 630
		3	3	0	2	1	0	8 630
5	Lq.	3	3	2	1	1	0	9 728
		3	2	3	1	1	0	9 728
	Lv.	3	2	3	0	1	0	8 630
		3	3	2	2	1	0	42 760
6	Lq.	3	3	2	2	0	2	44 370
		3	2	2	2	2	0	21 880
	Lv.	2	1	3	0	0	0	863
		3	3	2	3	2	0	191 000
7	Lq.	3	2	3	2	2	1	97 730
		3	3	3	2	1	0	44 370
	Lv.	3	3	3	1	0	1	42 760
		3	2	2	0	0	0	1 902
8	Lq.	3	2	2	3	0	1	21 880
		3	3	2	0	2	0	9 728
	Lv.	3	3	3	1	0	0	19 020
		2	2	1	3	2	0	19 020

* Lq Material liquidificado
 Lv Água de lavagem

QUADRO I (Cont.)

Lote	Método * Método	Número de replicatas positivas para cada volume						N ^o estimado de coliformes por 1 g de folhas
		-1 10 ml	-2 10 ml	-3 10 ml	-4 10 ml	-5 10 ml	-6 10 ml	
9	Lq.	3	3	2	1	2	1	44 370
		3	3	2	2	1	0	21 880
	Lv.	3	2	2	2	0	0	8 630
		3	2	3	2	0	0	19 020
10	Lq.	3	3	2	2	3	0	97 730
		3	3	2	1	1	0	9 728
	Lv.	3	1	3	0	1	0	4 276
		3	0	3	1	0	0	1 902
11	Lq.	3	3	2	3	1	1	97 730
		3	2	1	2	2	2	44 370
	Lv.	3	2	1	1	1	0	4 276
		3	3	1	1	0	0	4 276
12	Lq.	3	3	2	0	2	0	9 728
		3	3	3	1	0	0	9 728
	Lv.	3	3	3	0	0	0	8 630
		3	3	2	0	1	0	8 630
13	Lq.	3	3	3	2	0	0	21 880
		3	3	1	3	1	0	21 880
	Lv.	3	3	2	1	0	0	8 630
		3	3	3	1	0	0	19 020
14	Lq.	3	1	0	0	1	0	219
		3	1	1	1	0	0	442
	Lv.	2	0	1	3	0	0	863
		2	1	1	0	0	0	190
15	Lq.	3	1	1	1	0	0	442
		3	2	2	0	0	0	973
	Lv.	2	1	1	1	0	0	428
		3	2	1	0	0	0	863
16	Lq.	3	3	3	0	0	0	4 416
		3	3	3	2	1	0	44 370
	Lv.	3	3	3	1	0	0	19 020
		3	3	3	1	0	0	19 020

*Lq. Material liquidificado
Lv. Água de lavagem

QUADRO I (Cont.)

Lote	Método*	Número de replicatas positivas para cada volume.						Nº estimado de coliformes por 1 g de folhas
		-1 10 ml	-2 10 ml	-3 10 ml	-4 10 ml	-5 10 ml	-6 10 ml	
17	Lq.	3	2	3	0	0	0	2 188
		3	3	0	0	0	0	442
	Lv.	3	2	1	0	0	0	863
		3	2	1	1	0	0	1 902
18	Lq.	3	0	0	0	1	0	97
		3	1	0	0	0	0	97
	Lv.	3	2	1	0	1	0	1 902
		3	1	0	1	0	0	428
19	Lq.	3	3	1	0	2	0	4 416
		3	3	3	0	1	0	9 728
	Lv.	3	3	3	1	0	0	19 020
		3	3	3	1	0	0	19 020
20	Lq.	3	3	3	2	1	0	44 370
		3	3	3	1	0	0	9 728
	Lv.	3	3	1	2	0	0	8 630
		3	3	0	0	1	0	1 902
21	Lq.	3	3	2	0	0	0	2 188
		3	3	2	0	0	0	2 188
	Lv.	3	3	2	1	0	0	8 630
		3	3	1	1	0	0	4 276
22	Lq.	3	3	3	1	1	0	21 880
		3	3	3	1	0	0	9 728
	Lv.	3	3	3	1	1	0	42 760
		3	3	3	2	1	0	86 300
23	Lq.	3	3	1	0	1	0	2 188
		3	3	2	1	0	0	4 416
	Lv.	3	3	1	2	0	0	8 630
		3	2	1	0	0	0	863
24	Lq.	3	3	2	1	0	1	9 728
		3	3	2	2	0	0	9 728
	Lv.	2	2	0	0	0	0	190
		3	3	2	0	0	0	4 276

* Lq Material liquidificado
Lv Água de lavagem

QUADRO I (Cont.)

Lóte	* Método	Número de replicatas positivas para cada volume						Nº estimado de coliformes por 1 g de fôlhas
		-1 10 ml	-2 10 ml	-3 10 ml	-4 10 ml	-5 10 ml	-6 10 ml	
25	Lq.	3	3	3	1	1	2	97 730
		3	3	3	3	3	0	461 400
	Lv.	3	3	3	3	0	0	86 300
		3	2	2	2	1	0	19 020
26	Lq.	3	3	1	0	0	0	973
		3	3	2	1	0	0	4 416
	Lv.	3	3	2	0	0	0	4 276
		3	3	3	0	0	0	8 630
27	Lq.	3	2	1	2	0	0	2 188
		3	2	2	0	0	0	973
	Lv.	3	3	1	1	0	0	4 276
		3	1	1	0	0	1	863
28	Lq.	2	1	2	0	1	0	442
		1	2	1	1	0	1	442
	Lv.	2	2	0	1	1	1	1 902
		3	2	0	1	1	0	1 902
29	Lq.	3	3	1	3	0	0	9 728
		3	3	1	0	1	1	4 416
	Lv.	2	2	1	0	1	0	863
		3	2	0	0	0	0	428
30	Lq.	2	3	1	0	0	0	442
		3	1	1	1	0	0	442
	Lv.	3	2	2	1	0	0	4 276
		3	1	1	1	0	0	863
31	Lq.	3	3	1	0	1	0	2 188
		3	3	2	0	1	0	4 416
	Lv.	3	2	0	1	0	0	863
		3	3	1	0	1	2	19 020
32	Lq.	3	3	1	1	0	0	2 188
		3	3	2	1	0	0	4 416
	Lv.	3	1	2	0	0	0	863
		2	2	1	0	0	0	428

* Lq Material liquidificado
Lv Água de lavagem

QUADRO I (Cont.)

Lote	Método *	Número de replicatas positivas para cada volume						N ^o estimado de coliformes por 1 g de fôlhas
		-1 10 ml	-2 10 ml	-3 10 ml	-4 10 ml	-5 10 ml	-6 10 ml	
33	Lq.	3	3	3	2	0	1	44 370
		3	3	3	3	0	0	44 370
	Lv.	2	3	3	0	0	0	4 276
		3	3	3	0	1	0	19 020
34	Lq.	3	3	3	0	0	0	4 416
		3	3	3	2	0	0	21 880
	Lv.	3	3	0	0	0	0	863
		3	3	2	0	0	0	4 276
35	Lq.	3	3	1	0	0	0	9 728
		3	2	1	0	0	0	442
	Lv.	3	2	1	1	0	0	1 902
		2	3	0	1	0	0	863
36	Lq.	3	3	0	1	0	0	2 188
		3	1	0	0	0	0	2 188
	Lv.	3	2	2	1	0	0	1 902
		3	3	2	0	0	0	190
37	Lq.	3	3	2	3	2	1	223 900
		3	3	1	0	2	1	9 728
	Lv.	3	3	2	2	0	0	19 020
		3	3	3	1	0	0	19 020
38	Lq.	3	3	3	2	3	0	223 900
		3	3	3	3	3	2	2 825 000
	Lv.	3	3	3	0	0	0	8 630
		3	3	2	1	0	0	8 630
39	Lq.	3	3	3	3	1	1	223 900
		3	3	3	2	0	0	21 880
	Lv.	3	3	2	3	2	0	191 000
		3	3	2	1	0	0	8 630
40	Lq.	3	3	3	3	2	2	1 089 000
		3	3	3	3	0	0	443 700
	Lv.	3	2	3	1	0	0	8 630
		3	3	2	2	1	0	42 760

*Lq Material liquidificado
Lv Água de lavagem

QUADRO I (Cont.)

Lote	Método	Número de replicatas positivas para cada volume						Nº estimado de coliformes por 1 g de fôlhas
		-1 10 ml	-2 10 ml	-3 10 ml	-4 10 ml	-5 10 ml	-6 10 ml	
41	Lq.	2	3	2	1	1	0	4 416
		3	2	1	0	0	0	442
	Lv.	3	2	1	0	0	0	863
		3	2	2	0	1	0	4 276
42	Lq.	3	3	3	2	1	0	44 370
		3	3	3	2	0	0	21 880
	Lv.	3	3	3	2	0	0	42 760
		3	2	3	3	0	0	42 760
43	Lq.	2	3	3	2	0	0	9 728
		3	3	3	0	0	0	4 416
	Lv.	2	1	2	2	1	0	4 276
		2	3	2	1	0	0	4 276
44	Lq.	3	3	2	2	0	0	9 728
		3	2	3	0	0	0	2 188
	Lv.	3	1	2	1	0	0	1 902
		3	3	2	1	0	0	8 630
45	Lq.	3	3	3	1	0	0	9 728
		3	3	3	0	1	0	9 728
	Lv.	3	3	2	0	0	0	4 276
		3	3	2	1	0	0	8 630
46	Lq.	3	3	1	2	0	0	4 416
		3	3	3	1	0	0	9 728
	Lv.	3	1	1	0	0	0	428
		2	2	2	0	1	1	4 276

Lq Material liquidificado
 Lv Água de lavagem

A média aritmética dos valores encontrados por meio da água de lavagem foi 15.751 coliformes por grama de alface e a dos valores obtidos pela liquidificação, 88.830; as médias geométricas, respectivas foram 5.200 e 9.597.

A análise estatística dos resultados foi feita com os logaritmos dos números estimados de coliformes, uma vez que a experiência vem demonstrado ser necessária essa transformação para obter distribuição normal dos valores.

Foi feita uma análise de variância (Quadro II) que demonstrou ser a diferença, observada entre os dois métodos, significativa ao nível de 5%. Não foi significativa a interação entre métodos e lotes, o que indica não ter sido a diferença entre métodos dependente da variação entre lotes.

QUADRO II - ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Fonte de variação	G. L.	Variância	F
Métodos	1	1,960	5,53 *
Lotes	45	1,762	4,33 **
Métodos x Lotes	45	0,409	1,16
Erro	92	0,354	

II- COMPARAÇÃO MEDIANTE A DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ESCHERICHIA COLI

Devido ao grande número de resultados irregulares observados na série de exames da experiência precedente, foi efetuada nova comparação entre os métodos de obtenção de bactérias da alface, mediante técnicas bacteriológicas mais rigorosas. Foram empregados métodos bacteriológicos quantitativos para a determinação de E. coli, os quais, em outras experiências, que serão relatadas posteriormente, haviam demonstrado mais simples e eficientes que aqueles de determinação de coliformes.

a) Métodos - Tanto no método utilizando água de lavagem como no de liquidificação empregamos água tamponada com pH 7,2 a 4° C, em vez de água destilada à temperatura ambiente. Na liquidificação passou-se a usar um volume de água correspondente a duas vezes o peso das folhas.

Maiores cuidados foram tomados no preparo das diluições destinadas à medida dos diferentes volumes para exame, na tentativa de reduzir ao mínimo as possíveis causas de variação daí decorrentes.

Quarenta e um lotes, constituídos de 2 pés de alface cada um, foram submetidos ao exame pelos dois métodos. Os lotes foram obtidos de 7 diferentes fornecedores.

Após desprezarem-se as folhas externas dilaceradas ou deterioradas, cada alface era desfolhada totalmente, com cuidados de assepsia, e as folhas eram mantidas na ordem natural em que eram retiradas. Considerando-se as folhas de cada alface, para cada par sucessivo, atribuía-se uma delas, pelo uso de números casuais, a um dos tratamentos, e, a restante, ao outro.

A determinação do número de Escherichia coli foi feita pelo processo que utilizava produção de gás em meio LAB, após 24 h de incubação a 43° C, como evidência da presença desse germe. A fim de assegurar uniformidade das condições de incubação dos diferentes tubos de LAB, a posição desses tubos na estufa era alternada de forma a se obter, em dias sucessivos de experimentação, um delineamento balanceado com relação a cada um dos dois métodos em comparação.

Cada um dos materiais provenientes de cada lote foi submetido a 2 exames, a partir de duas séries de diferentes volumes. Em cada exame inocularam-se 4 replicatas de cada um de 5 volumes decrescentes com razão decimal, partindo de 10 ml.

b) Resultados - O Quadro III apresenta os resultados obtidos para cada exame; número de replicatas positivas para cada volume e o correspondente N.M.P. de Escherichia coli por 100 g de folhas de alface. A regularidade que, de um modo geral, se observou na queda do número de resultados positivos à medida que decresciam os volumes usados em cada exame, permitiu o emprego das tabelas de Hoskins()

QUADRO III

Resultados da determinação do número de Escherichia coli obtido por 1 diluição e por " Lavagem " em diferentes lotes de alface.

Lote	Método [⌘]	Número de replicatas positivas para cada volume.					N.M.P. por 100 g de fôlhas
		1 10 ml	0 10 ml	-1 10 ml	-2 10 ml	-3 10 ml	
1	Lq.	3	3	3	0	0	172,8
		3	2	3	0	0	144
	Lv.	4	3	2	0	0	1.100
		3	1	0	0	0	80
2	Lq.	4	4	3	1	0	5.760
		4	4	3	2	1	10.080
	Lv.	4	4	2	0	0	3.100
		4	4	1	0	0	1.800
3	Lq.	4	3	2	2	0	1.296,
		4	3	2	0	0	792
	Lv.	4	4	1	0	0	1.800
		4	0	1	0	0	170
4	Lq.	3	0	0	1	0	57,6
		3	2	0	0	0	75,6
	Lv.	4	2	1	0	0	470
		4	0	2	0	0	250
5	Lq.	4	3	0	0	0	396
		4	4	2	0	0	2.232
	Lv.	4	4	3	3	0	14.000
		4	4	0	0	0	1.150
6	Lq.	2	3	0	0	0	61,2
		3	3	0	0	0	100,8
	Lv.	4	4	2	1	0	4.700
		4	4	2	1	0	4.700
7	Lq.	1	3	0	0	0	39,6
		0	0	1	0	0	8,3
	Lv.	2	1	0	0	0	46,5
		1	0	0	0	0	13

⌘ Lq* Material liquidificado

Lv= Água de lavagem

QUADRO III

Resultados da determinação do número de Escherichia coli obtido por liquidação e por " Lavagem " em diferentes lotes de alface.

Lote	Método ^π	Número de replicatas positivas para cada volume.					N.M.P. por 100 g de fôlhas
		1 10 ml	0 10 ml	-1 10 ml	-2 10 ml	-3 10 ml	
1	Lq.	3	3	3	0	0	172,8
		3	2	3	0	0	144
	Lv.	4	3	2	0	0	1.100
		3	1	0	0	0	80
2	Lq.	4	4	3	1	0	5.760
		4	4	3	2	1	10.080
	Lv.	4	4	2	0	0	3.100
		4	4	1	0	0	1.800
3	Lq.	4	3	2	2	0	1.296,
		4	3	2	0	0	792
	Lv.	4	4	1	0	0	1.800
		4	0	1	0	0	170
4	Lq.	3	0	0	1	0	57,6
		3	2	0	0	0	75,6
	Lv.	4	2	1	0	0	470
		4	0	2	0	0	250
5	Lq.	4	3	0	0	0	396
		4	4	2	0	0	2.232
	Lv.	4	4	3	3	0	14.000
		4	4	0	0	0	1.150
6	Lq.	2	3	0	0	0	61,2
		3	3	0	0	0	100,8
	Lv.	4	4	2	1	0	4.700
		4	4	2	1	0	4.700
7	Lq.	1	3	0	0	0	39,6
		0	0	1	0	0	8,3
	Lv.	2	1	0	0	0	46,5
		1	0	0	0	0	13

π Lq= Material liquidificado

Lv= Água de lavagem

QUADRO III (Cont.)

Lote	* Método	Número de replicatas positivas para cada volume.					N.M.P. por 100 g de fôlhas
		1 10 ml	0 10 ml	-1 10 ml	-2 10 ml	-3 10 ml	
8	Lq.	1	0	1	0	0	18.4
		1	1	0	0	0	18.7
	Lv.	1	0	0	0	0	13
		3	1	0	0	0	80
9	Lq.	0	3	1	0	0	33,5
		3	2	0	0	0	75.6
	Lv	4	2	2	0	0	650
		3	2	1	0	0	135
10	Lq.	4	4	4	1	0	12.960
		4	4	1	0	0	1.296
	Lv.	4	4	1	0	0	1.800
		4	4	0	1	0	1.700
11	Lq.	4	4	4	3	0	39.600
		4	4	4	1	0	12.960
	Lv.	4	4	1	1	0	2.750
		4	4	3	1	0	5.500
12	Lq.	4	4	4	2	1	33.840
		4	4	4	3	1	57.600
	Lv.	4	4	4	0	0	11.500
		4	4	4	1	0	18.000
13	Lq.	4	2	2	0	0	468
		4	4	3	2	0	7.920
	Lv.	2	0	1	0	0	45,5
		3	1	1	0	0	105
14	Lq.	4	4	3	0	0	3.960
		4	4	2	0	0	2.232
	Lv.	3	0	0	0	0	55
		3	3	0	0	0	140

* Lq Material liquidificado
Lv Água de Lavagem

QUADRO III (Cont.)

Lote	Método *	Número de replicatas positivas para cada volume.					N.M.P. por 100 g de folhas
		1 10 ml	0 10 ml	-1 10 ml	-2 10 ml	-3 10 ml	
15	Lq.	4	4	1	2	0	2.916
		4	3	3	3	0	1.728
	Lv.	4	3	2	0	0	1.100
		4	3	0	1	0	830
16	Lq.	4	3	1	0	0	576
		4	3	1	0	0	576
	Lv.	3	0	0	0	0	55
		4	0	1	0	0	170
17	Lq.	4	4	2	4	1	9.000
		4	4	1	1	0	1.980
	Lv.	4	4	1	0	0	1.800
		4	3	1	0	0	800
18	Lq.	4	4	1	0	0	1.296
		4	3	1	1	0	792
	Lv.	4	1	1	0	0	105
		3	2	1	0	0	135
19	Lq.	4	4	4	1	1	19.800
		4	4	4	2	0	22.320
	Lv.	4	4	2	0	0	3.100
		4	4	2	4	0	10.500
20	Lq.	4	4	0	0	1	1.224
		4	4	4	3	1	57.600
	Lv.	4	4	3	0	0	5.500
		4	4	4	2	0	31.000
21	Lq.	4	4	4	2	0	22.320
		4	4	4	3	0	39.600
	Lv.	4	4	3	0	1	8.000
		4	4	0	0	0	1.150

* Lq Material liquidificado
Lv Água de lavagem

QUADRO III (cont.)

Lote	Método [※]	Número de replicatas positivas para cada volume.					N.M.P. por 100 g de folhas
		1 10 ml	0 10 ml	-1 10 ml	-2 10 ml	-3 10 ml	
22	Lq.	4	3	0	0	0	396
		3	4	1	0	0	154.8
	Lv.	4	2	0	0	0	310
		4	2	0	0	0	310
23	Lq.	4	3	0	0	0	396
		3	4	0	0	0	126
	Lv.	4	4	0	0	0	1.150
		4	3	0	1	0	800
24	Lq.	4	4	4	3	1	57.600
		4	4	4	4	3	504.000
	Lv.	4	3	1	0	0	800
		4	1	0	0	0	180
25	Lq.	2	4	3	0	0	118.8
		4	4	1	0	0	1.296
	Lv.	4	4	1	0	0	1.800
		4	4	1	0	0	1.800
26	Lq.	3	0	0	0	0	39.6
		3	3	1	0	0	576
	Lv.	1	2	0	0	0	40
		3	1	0	0	0	80
27	Lq.	3	1	0	0	0	57.6
		0	2	0	0	0	16.6
	Lv.	1	1	1	0	0	39.5
		3	0	0	0	0	55
28	Lq.	4	4	3	3	0	10.080
		4	4	4	2	0	22.320
	Lv.	4	4	1	0	0	1.800
		4	3	0	0	0	550

※ Lq Material liquidificado
Lv Água de Lavagem

QUADRO III (cont.)

Lote	Método *	Número de replicatas positivas para cada volume.					N.M.P. por 100 g de fôlhas
		1 10 ml	0 10 ml	-1 10 ml	-2 10 ml	-3 10 ml	
29	Lq.	4	4	1	0	0	1.296
		4	3	0	0	0	396
	Lv.	4	1	0	0	0	180
		3	3	1	0	0	170
30	Lq.	4	4	0	0	0	828
		3	2	0	0	0	75.6
	Lv.	3	0	0	0	0	55
		4	3	0	0	0	550
31	Lq.	4	3	3	1	0	1.224
		4	4	4	4	2	252.000
	Lv.	4	2	3	2	0	1.200
		2	0	0	0	0	30
32	Lq.	4	4	4	4	3	504.000
		4	4	4	2	1	33.840
	Lv.	4	3	1	0	0	800
		4	3	1	0	0	800
33	Lq.	4	4	4	2	4	75.600
		4	4	4	4	3	504.000
	Lv.	4	4	4	0	0	11.500
		4	3	0	0	0	5.500
34	Lq.	4	4	3	1	1	7.920
		2	4	3	1	0	133.2
	Lv.	4	3	1	0	0	800
		4	3	0	0	0	550
35	Lq.	4	4	4	2	2	46.800
		4	4	4	3	4	129.600
	Lv.	4	3	0	0	1	550
		4	4	3	2	3	20.000

* Lq Material liquidificado
Lv Água de Lavagem

QUADRO III (cont.)

Lote	* Método	Número de replicatas positivas para cada volume.					N.M.P. por 100 g de fôlhas
		1 10 ml	0 10 ml	-1 10 ml	-2 10 ml	-3 10 ml	
36	Lq.	4	1	0	0	0	180
		4	3	1	0	0	800
	Lv.	4	1	0	0	0	180
		4	3	0	1	0	800
37	Lq.	4	2	0	0	0	850
		4	0	0	0	0	310
	Lv.	4	2	3	0	0	850
		4	2	0	0	0	310
38	Lq.	4	1	0	0	0	55
		4	3	0	0	0	396
	Lv.	3	0	0	0	0	55
		4	0	0	0	0	115
39	Lq.	4	4	2	0	1	1.150
		4	4	0	0	0	828
	Lv.	4	4	0	0	0	1.150
		4	0	0	0	0	115
40	Lq.	4	2	1	1	0	1.400
		4	2	1	0	0	180
	Lv.	4	3	2	1	0	1.400
		4	1	0	0	0	180
41	Lq.	4	4	2	0	0	115
		4	3	0	0	0	180
	Lv.	4	0	0	0	0	115
		4	1	0	0	0	180

* Lq Material liquidificado
Lv Água de Lavagem

para a avaliação dos N.M.P., os quais apresentam a vantagem de maior precisão que os números estimados anteriormente.

A média aritmética dos valores encontrados por meio da "água de lavagem" foi 2.422 *Escherichia coli* por 4.00 g de fôlhas de alface e a dos valores obtidos pela liquidificação, 30.974. Foram, as médias geométricas respectivas, 539 e 1.377.

A análise estatística dos resultados, feita com os logaritmos dos N.M.P. demonstrou (Quadro III-A) ser altamente significativa a diferença observada entre os métodos. Também a interação entre métodos e lotes foi, neste caso, significativo.

QUADRO III-A - ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Fonte de variação	G.L.	Variância	F
Métodos	1	6,3009	8,5 ^{***}
Lotes	40	2,7261	3,702 ^{***}
Métodos x Lotes	40	0,7364	3,14 ^{***}
Erro	82	0,2345	

III - CONCLUSÃO

Revelou-se o método de liquidificação, portanto, superior ao da água de lavagem na obtenção de coliformes da alface. Este resultado poderia ser esperado, a priori, uma vez que o material liquidificado contém necessariamente todas as bactérias presentes nas folhas examinadas, enquanto não se pode afirmar o mesmo da "água de lavagem". Baseados nessas razões, Rudolfs, Falk e Ragotzkie (167) empregaram exclusivamente o método de liquidificação do vegetal em todos os seus estudos, sem antes ter efetuado comparação entre os dois métodos.

Deve-se considerar, porém, que a liquidificação poderia destruir bactérias em número apreciável, seja mecanicamente, seja mediante a liberação de substâncias bactericidas presentes nas folhas (226), a ponto de se tornar o método desvantajoso.

Ademais, há indicações de que material liquidificado proveniente de verduras, quando adicionado ao caldo lactosado, pode in-

terferir na atividade dos coliformes *.

Em vista de tais hipóteses, tornava-se necessária a comparação experimental da eficiência do método de liquidificação, o qual conforme resulta da investigação descrita neste capítulo, se demonstra significativamente superior ao método de lavagem.

* Comunicação pessoal do Dr. P.W. Kabler, do Robert A. Taft Sanitary Engineering Center, Cincinnati, Ohio, U.S.A.

Capítulo III

INVESTIGAÇÃO SOBRE O GRAU DE CONTAMINAÇÃO DE ALFACE, DISTRIBUÍDA EM SÃO PAULO, POR BACTÉRIAS DE ORIGEM FECAL E SOBRE METODOS BACTERIO-LÓGICOS PARA SUA DETERMINAÇÃO

I - AMOSTRAGEM

A amostragem levada a efeito na presente investigação teve por objetivo obter dados representativos da alface distribuída nas feiras livres da cidade de São Paulo.

Este critério foi adotado tendo em vista a impressão generalizada de que a maior parte da alface consumida em São Paulo é vendida nas feiras. Tivemos de nos ater a essa impressão, em virtude da inexistência de dados oficiais sobre o consumo e locais de distribuição dessa hortaliça. Também não foi possível obter informações satisfatórias a respeito do contingente de contribuição das diversas plantações de São Paulo e arredores para o consumo de alface da cidade, ou mesmo sobre a localização precisa das plantações.

Outrossim, nestes estudos, que visavam sobretudo estabelecer técnicas eficientes e fazer o levantamento das condições sanitárias do produto distribuído à população, pareceu-nos interessante examinar a alface obtida no local e na ocasião em que é vendida ao consumidor. Estudos posteriores, a serem feitos nas plantações, obedecerão a outra orientação, constituindo etapa ulterior, destinada a verificar se aí se origina o maior contingente de contaminação, como parece mais provável. Nesse caso, caberá estudar as causas dessa contaminação, investigando a correlação entre o teor de bactérias de origem fecal na alface e o grau de contaminação do solo e da água de irrigação.

Tendo em vista a finalidade da presente investigação, verificamos, por meio de lista fornecida pelo Departamento de Abastecimento da Prefeitura, funcionarem uma vez por semana, de segunda a sexta-feira, 167 feiras, distribuídas em toda a área da cidade. A fim de se obter amostra isenta da influência de qualquer prejulgamento, para cada um dos cinco dias referidos foram sorteadas 8 feiras, mediante tabela de números casuais.

As 40 feiras assim selecionadas distribuíam-se de maneira a proximadamente uniforme por t \ddot{o} da a área da cidade, conforme representado na Figura 1.

Durante 4 semanas, em cada um dos dias mencionados, visitamos duas das feiras sorteadas. Em cada feira visitada adquirimos, de cada um de 2 vendedores, 4 pés de alface, os quais constituíram um lote; dessa forma, de cada feira provieram 2 lotes.

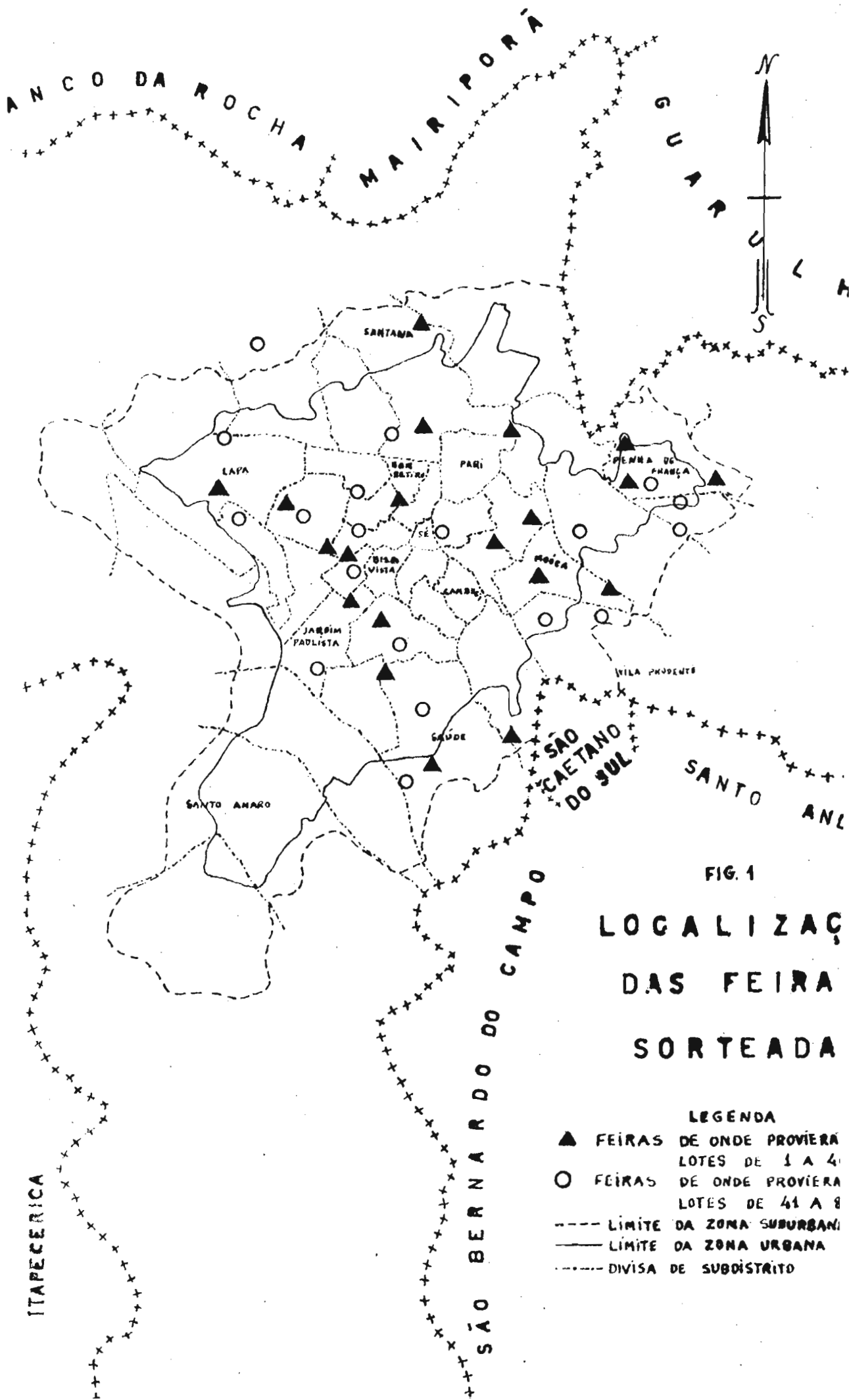
De cada alface, tomaram-se para exame 7 f \ddot{o} lhas, provenientes de igual n \ddot{u} mero de n \ddot{u} veis conc \ddot{e} ntricos. A escolha dessas f \ddot{o} lhas era feita da maneira descrita a seguir. Desfolhada a alface, com cuidados de ~~as~~ assepsia, mantinham-se t \ddot{o} das as f \ddot{o} lhas na ordem natural em que eram retiradas. O quociente do n \ddot{u} mero total de f \ddot{o} lhas por 7, determinava o n \ddot{u} mero existente em cada n \ddot{u} vel. Tomava-se a f \ddot{o} lha cuja posi \ddot{c} o \ddot{a} correspondia mais aproximadamente ao ponto m \ddot{e} dio de cada n \ddot{u} vel, como representativa do mesmo. As 28 f \ddot{o} lhas ~~sele~~ selecionadas de cada lote eram liquidificadas conjuntamente, num volume de água tamponada, a 4 $^{\circ}$ C, correspondente a duas v \ddot{e} zes o p \ddot{e} so das f \ddot{o} lhas.

II - GRAU DE CONTAMINA \ddot{C} AO NOS DIFERENTES N \ddot{U} VEIS CONC \ddot{E} NTRICOS DE F \ddot{O} LHAS

a) M \ddot{e} todos - A conveni \ddot{e} ncia em se realizar a amostragem das f \ddot{o} lhas de alface da maneira acima descrita, decorreu dos resultados de uma investiga \ddot{c} o \ddot{a} pr \ddot{e} via, na qual foi constatada a presen \ddot{c} a de n \ddot{u} mero consider \ddot{a} vel de bact \ddot{e} rias nos diversos n \ddot{u} veis conc \ddot{e} ntricos, desde as f \ddot{o} lhas externas at \ddot{e} \grave{a} s mais centrais.

Nessa investiga \ddot{c} o \ddot{a} , foram considerados 6 n \ddot{u} veis de f \ddot{o} lhas, sendo tomadas, de cada alface, 2 f \ddot{o} lhas de cada n \ddot{u} vel. A sele \ddot{c} o \ddot{a} das f \ddot{o} lhas, e a amostragem de cada n \ddot{u} vel foram feitas de maneira semelhante \grave{a} descrita acima. Foram examinados 5 lotes com 15 p \ddot{e} s de alface cada um, sendo as 30 f \ddot{o} lhas de cada n \ddot{u} vel, em cada lote, liquidificadas conjuntamente, com volume de água destilada correspondente ao p \ddot{e} so das f \ddot{o} lhas.

Com o material de cada liquidifica \ddot{c} o \ddot{a} , fizeram-se 2 exames para determina \ddot{c} o \ddot{a} do n \ddot{u} mero de coliformes, pela prova de confirma \ddot{c} o \ddot{a} em LBVB e 2 exames para a determina \ddot{c} o \ddot{a} de enterococos pela prova de confirma \ddot{c} o \ddot{a} em AEV.



QUADRO IV

Determinação do número de coliformes obtidos de níveis concêntricos de fôlhas de alface de diferentes lotes.

Lote	Nível	Número de replicatas positivas por volume (ml)						N.M.P. por 1 g de folhas
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
1	1	3 3	3 3	3 3	3 3	1 3	1 1	201.750 1.237.400
	2	3 3	3 3	3 3	2 3	2 1	1 0	77.430 114.810
	3	3 3	3 3	3 3	3 3	2 3	0 0	235.290 607.200
	4	3 3	3 3	3 3	2 1	0 0	1 0	37.050 10.621
	5	3 3	3 3	3 3	3 2	0 2	1 0	96.720 52.080
	6	3 3	3 3	3 3	1 0	0 0	0 0	5.635 10.535
2	1	3 3	3 3	3 3	3 3	1 0	0 0	115.670 61.870
	2	3 3	3 3	3 3	2 2	1 1	0 0	40.050 40.050
	3	3 3	3 3	3 3	3 3	1 0	0 0	108.790 58.190
	4	3 3	3 3	3 3	3 2	1 0	0 1	106.210 37.050
	5	3 3	3 3	2 1	0 1	0 1	0 0	2.306 2.976
	6	3 3	1 3	2 3	0 0	0 0	0 0	294 5.635

QUADRO IV (Cont.)

Lote	Nível	Número de replicatas positivas por volume (ml)						N.M.P. por 1 g de fôlhas
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
3	1	3 3	3 3	3 3	3 3	1 2	1 0	201.750 250.170
	2	3 3	3 3	3 3	3 3	1 2	0 0	114.810 248.310
	3	3 3	3 3	3 3	2 3	3 2	0 0	73.370 235.290
	4	3 3	3 3	3 3	1 2	0 0	0 0	10.621 22.971
	5	3 3	3 3	3 3	2 2	2 2	0 0	5.208 5.208
	6	3 3	3 3	3 3	3 1	1 0	0 0	105.350 10.535
4	1	3 3	3 3	3 3	3 3	1 2	1 1	201.750 250.170
	2	3 3	3 3	3 3	3 3	3 1	1 0	1.228.200 114.810
	3	3 3	3 3	3 3	1 0	0 1	0 0	10.879 9.867
	4	3 3	3 3	1 3	0 0	0 0	0 0	1.062 5.681
	5	3 3	3 3	3 3	0 0	0 0	0 0	5.704 5.704
	6	3 3	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	56 56
5	1	3 3	3 3	3 3	3 2	2 2	0 0	250.170 56.490
	2	3 3	3 3	3 3	2 3	3 2	3 1	141.510 400.500
	3	3 3	3 3	3 3	1 3	1 2	1 0	30.360 134.090
	4	3 3	3 3	3 3	2 1	1 0	0 0	37.050 10.621
	5	3 3	3 3	3 3	1 1	0 0	0 0	10.664 10.664
	6	3 3	3 3	2 1	0 0	0 0	0 0	2.278 1.053

QUADRO V

Determinação do número de enterococos obtidos de níveis concêntricos de folhas de alface de diferentes lotes .

Lote	Nível	Número de replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1 g de folhas
		-1	-2	-3	-4	-5	
		10	10	10	10	10	
1	1	0	1	0	0	0	8,1
		0	0	2	0	0	16,1
	2	2	2	1	0	0	74,8
		3	2	2	0	0	560,7
	3	3	2	1	1	0	531,3
		3	2	3	0	0	733,7
	4	1	0	0	0	0	8,9
		2	0	0	0	0	22,5
	5	1	0	0	0	0	8,9
		1	0	0	0	0	8,9
	6	0	0	0	0	0	< 7,4
		0	0	0	0	0	< 7,4
2	1	3	3	1	0	0	1.156,7
		3	3	0	1	0	1.049,1
	2	3	3	0	0	0	614,1
		3	2	0	0	0	248,3
	3	3	3	1	1	0	1.897,5
		3	0	0	0	0	58,2
	4	2	1	0	0	0	37,1
		1	0	0	0	0	8,9
	5	3	0	0	0	0	57,0
		3	2	0	0	0	28,8
	6	0	0	0	0	0	< 7,4
		0	0	0	0	0	< 7,4

QUADRO V (Cont.)

Lote	Nível	Número de replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1 g de fôlhas
		⁻¹ 10	⁻² 10	⁻³ 10	⁻⁴ 10	⁻⁵ 10	
3	1	3	0	0	0	0	61,9
		3	2	0	0	0	250,2
	2	3	3	1	0	0	1.228,2
		3	3	0	0	0	640,8
	3	2	1	0	0	0	38,0
		0	0	0	0	0	< 7,4
4	3	0	0	0	0	56,8	
	0	1	0	0	0	7,4	
5	3	0	1	0	0	96,7	
	3	2	0	0	0	230,6	
6	1	0	0	0	0	8,8	
	0	0	0	0	0	< 7,4	
4	1	2	0	1	0	1	37,7
		2	1	1	0	0	53,8
	2	3	2	0	0	0	248,3
		2	0	0	0	0	24,3
	3	1	0	1	0	0	18,2
		1	1	0	0	0	18,5
4	1	0	0	0	0	8,9	
	0	1	0	0	0	7,4	
5	0	0	0	0	0	< 7,4	
	0	0	0	0	0	< 7,4	
6	0	0	0	0	0	< 7,4	
	0	0	0	0	0	< 7,4	
5	1	3	3	1	0	0	1.237,4
		3	2	1	0	0	403,5
	2	3	1	1	1	0	320,4
		3	1	0	0	0	114,8
	3	3	0	0	0	0	58,2
		1	1	0	0	0	18,5
4	1	0	0	0	0	8,9	
	1	0	0	0	0	8,9	
5	0	0	0	0	0	< 7,4	
	0	0	0	0	0	< 7,4	
6	0	0	0	0	0	< 7,4	
	0	0	0	0	0	< 7,4	

Nas determinações de coliformes, examinaram-se 3 replicatas de cada um de 6 volumes decrescentes com razão decimal; nas de enterococos, examinou-se o mesmo número de replicatas de cada um de 5 volumes, decrescentes na mesma razão. A partir dos resultados de cada exame, foi estimado o correspondente número mais provável de bactérias por unidade de peso de fôlhas.

b) * Resultados - Nos Quadros IV e V são apresentados os resultados dessas determinações, para coliformes e para enterococos, respectivamente com relação aos diversos níveis das fôlhas, os quais são numerados de fora para dentro de 1 a 6. Estão agrupadas no Quadro VI as médias dos números mais prováveis de bactérias nos lotes examinados. Embora se verifique intenso decréscimo no grau de contaminação da alface à medida que se consideram níveis mais internos de fôlhas, constata-se que mesmo os níveis mais centrais fornecem apreciável índice de contaminação.

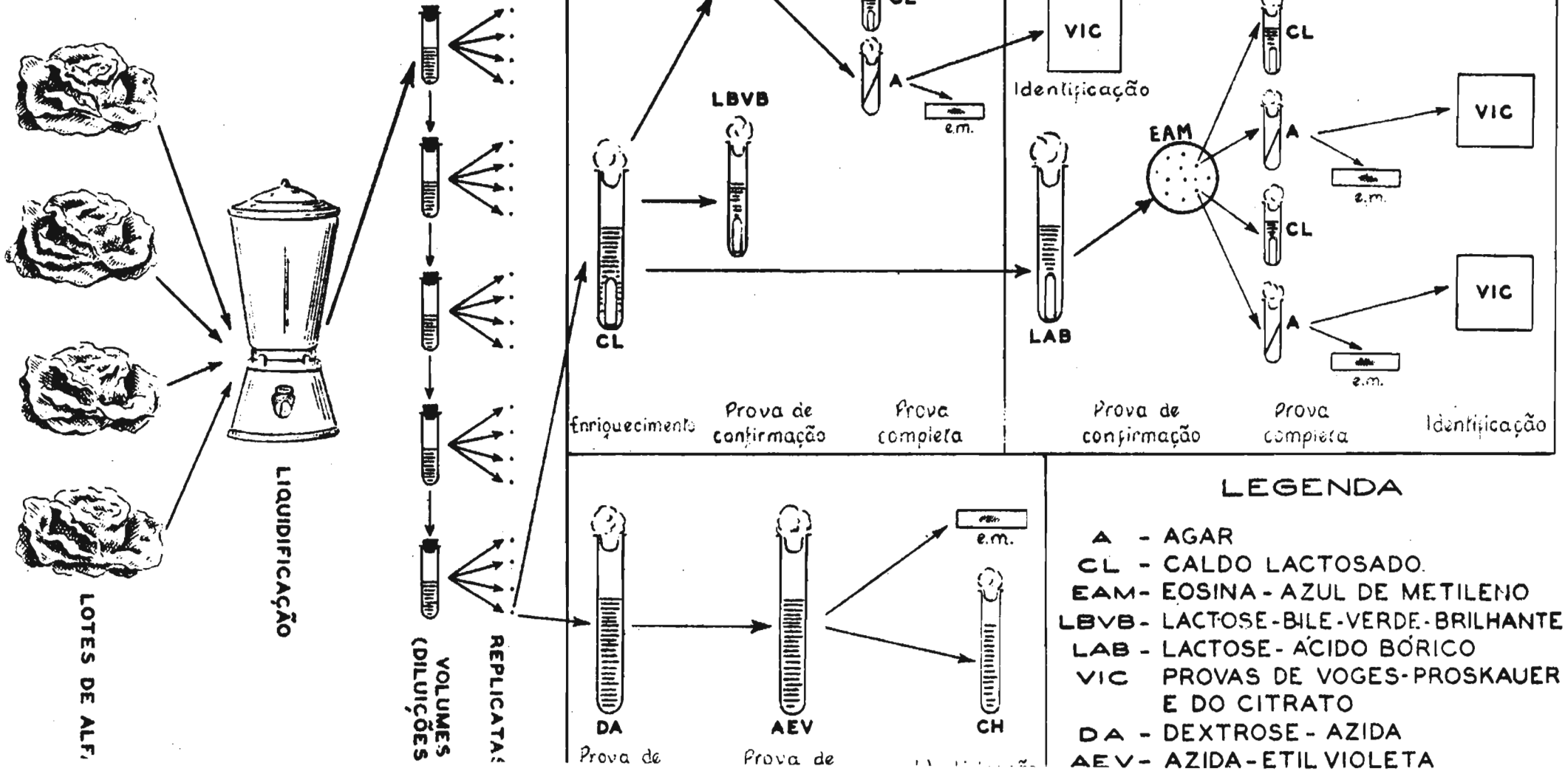
QUADRO VI - NMP DE COLIFORMES E DE ENTEROCOCOS NOS DIVERSOS NÍVEIS CONCENTRICOS DAS FOLHAS DE ALFACE.
(MÉDIAS POR GRAMA DE FOLHAS)

NÍVEIS	COLIFORMES		ENTEROCOCOS	
	MÉDIA ARITMÉTICA	MÉDIA GEOMÉTRICA	MÉDIA ARITMÉTICA	MÉDIA GEOMÉTRICA
1	282719	176000	427	138
2	252048	130400	407	254
3	150332	76340	338	73
4	18335	15680	18	13
5	19723	8995	46	20
6	14143	1956	7	17

III - INTENSIDADE DE CONTAMINAÇÃO DAS AMOSTRAS COLHIDAS, CONFORME DETERMINAÇÃO POR DIFERENTES MÉTODOS

A investigação do grau de contaminação da alface por bactérias de origem fecal, foi desenvolvida para os 80 lotes referidos acima ao se considerar o processo de amostragem. Na figura 2 estão sintetizadas as diferentes fases dos diversos exames bacteriológicos aos

FIG. 2 - ESQUEMA DOS EXAMES BACTERIOLÓGICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MICRORGANISMOS DE ORIGEM FECAL NA ALFACE.



aos quais se procedeu, às vêzes concomitantemente, outras vêzes em sucessão, seja para o conjunto, seja para uma parte do material investigado, conforme descrito a seguir.

a) Determinação de coliformes

Para os 80 lotes investigados, foi feita a prova completa para determinação de coliformes. Os resultados, expressos como os NMP por grama de fôlhas correspondentes a cada lote, são apresentados no Quadro VII.

Em vista da quantidade de trabalho, tempo e material requeridos na execução da prova completa, decidiu-se investigar os resultados da aplicação de método mais simples - neste caso, a prova de confirmação em caldo LBVB.

Essa investigação foi realizada para os lotes 41 a 80, concomitantemente à prova completa para coliformes correspondentes aos mesmos lotes. No Quadro VIII são fornecidos os resultados da prova em LBVB, bem como os NMP para essa prova. Para fins de comparação, são incluídos também nesse quadro os NMP obtidos, para os mesmos lotes, pela prova completa mediante identificação de colônias isoladas em EAM.

Foi feita uma comparação estatística entre os resultados obtidos pelos dois métodos. A média geométrica dos quocientes da divisão de cada NMP da prova completa pelo correspondente NMP da prova em LBVB, é 0,3888, com limites fiduciais, para 95% de probabilidade, estimados em 0,2532 e 0,5969. A mediana dos mesmos quocientes é 0,3261, com limites fiduciais estimados em 0,2163 e 0,5000.

Conforme êsses resultados, o método de confirmação pelo LBVB evidencia números significativamente maiores de germes suspeitos de pertencerem ao grupo dos coliformes, do que a prova completa que se utilizou para caracterizar êsse grupo. Embora seja a prova em LBVB largamente usada para a determinação de coliformes na água, quando também geralmente revela maior número de germes dêsse grupo do que a prova completa, o achado, na presente investigação, de um valor próximo a $2\frac{1}{2}$ vêzes para essa relação, levanta dúvidas sôbre a possível maior sensibilidade do método, sugerindo antes que a prova em LBVB, quando aplicada ao

QUADRO VII

Determinação do número de coliformes pela prova completa,
para os diferentes lotes de alface

Lotes	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de folhas	Lotes	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de folhas
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
1	3	3	3	1	1	20.500	21	3	3	0	1	0	1.402
2	3	3	3	3	2	418.000	22	2	2	2	0	0	133
3	2	2	1	0	0	106	23	3	3	2	2	0	7.900
4	3	3	1	1	0	2.850	24	3	3	1	1	0	2.850
5	3	3	3	3	3	418.000	25	3	2	1	1	0	760
6	3	3	3	2	0	35.340	26	3	3	2	1	0	5.700
7	3	2	2	1	1	1.330	27	3	1	2	0	0	456
8	3	2	3	3	0	2.014	28	3	3	1	2	1	6.000
9	3	3	0	0	0	912	29	0	0	1	0	0	11
10	3	3	3	3	2	418.000	30	3	3	3	0	1	14.020
11	3	3	2	0	1	5.700	31	3	3	3	1	1	20.500
12	2	1	0	0	0	57	32	3	3	3	3	0	91.200
13	3	3	2	2	0	7.980	33	3	3	1	0	0	1.634
14	3	3	3	0	0	9.120	34	3	3	3	3	1	174.000
15	3	3	3	3	0	91.200	35	3	3	3	2	1	57.000
16	3	3	2	2	0	7.980	36	3	3	3	3	1	174.800
17	3	3	2	0	0	3.534	37	3	3	2	0	0	4.130
18	2	1	0	0	0	57	38	3	3	3	2	0	35.340
19	3	3	2	0	0	3.534	39	3	3	3	0	0	9.120
20	3	3	3	3	1	174.800	40	3	3	3	3	1	174.800

QUADRO VII (continuação)

Lotes	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de fôlhas	Lotes	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de fôlhas
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}			10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
41	3	3	3	2	0	35.340	61	3	2	3	3	1	174.000
42	3	3	3	3	0	91.200	62	3	3	3	2	1	57.000
43	3	3	3	1	0	17.480	63	3	3	3	3	1	174.000
44	3	3	3	1	1	20.500	64	3	3	3	1	1	20.500
45	3	3	3	2	1	57.000	65	3	3	3	3	1	174.000
46	3	3	1	0	0	1.740	66	3	3	3	1	0	17.480
47	3	3	3	3	0	91.200	67	3	3	3	2	0	35.340
48	3	3	2	0	0	3.534	68	3	3	3	2	2	79.800
49	3	3	3	3	2	410.000	69	3	3	3	1	2	45.000
50	3	3	2	1	3	12.920	70	3	3	3	0	0	9.120
51	3	3	3	2	0	35.340	71	3	3	3	3	1	174.000
52	3	3	3	2	1	57.000	72	3	3	3	0	0	9.120
53	3	3	3	2	0	35.340	73	3	3	3	1	0	17.480
54	3	3	3	3	2	410.000	74	3	3	3	1	1	20.500
55	3	3	3	2	1	57.000	75	3	3	3	1	0	17.480
56	3	3	3	3	0	91.200	76	3	3	3	0	0	9.120
57	3	3	3	3	1	174.000	77	3	3	3	3	0	91.200
58	3	3	3	3	1	174.000	78	3	3	3	1	1	20.500
59	3	3	3	2	0	35.340	79	3	3	3	3	0	91.200
60	3	3	3	2	0	35.340	80	3	3	2	2	0	7.930

QUADRO VIII

Determinação do número de coliformes pela prova de confirmação em LBVB, em correspondência aos NMP obtidos na prova completa para coliformes.

Lotes	Prova de confirmação em LBVB					Pró completa	
	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg de fôlhas	N.M.P. por lg de fôlhas
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}		
41	3	3	3	1	0	16.340	35.340
42	3	3	3	3	2	418.000	91.200
43	3	3	3	1	0	13.340	17.480
44	3	3	3	3	2	418.000	28.500
45	3	3	1	0	0	1.748	57.000
46	3	3	3	2	0	35.340	1.748
47	3	3	3	3	2	418.000	91.200
48	3	3	3	1	0	16.340	3.534
49	3	3	3	3	2	418.000	418.000
50	3	3	3	3	1	174.800	12.920
51	3	3	3	3	0	91.200	35.340
52	3	3	3	3	1	174.800	57.000
53	3	3	3	3	1	174.800	35.340
54	3	3	3	3	2	418.000	418.000
55	3	3	3	2	0	35.340	57.000
56	3	3	3	3	2	418.000	91.200
57	3	3	3	2	1	174.800	174.800
58	3	3	3	3	3	418.000	174.800
59	3	3	3	3	2	418.000	35.340
60	3	3	3	3	0	91.200	35.340

QUADRO VIII (continuação)

Lotos	Prova de confirmação em LBVB					Pr. completa	
	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg de fôlhas	N.M.P. por lg de fôlhas
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		
61	3	2	3	3	3	"	174.800
62	3	3	3	3	2	418.000	57.000
63	3	3	3	3	2	418.000	174.800
64	3	3	3	3	0	91.200	28.500
65	3	3	3	3	1	174.800	174.800
66	3	3	3	3	1	174.800	17.480
67	3	3	3	3	2	418.000	35.340
68	3	3	3	0	0	8.740	79.800
69	3	3	3	2	2	79.800	45.600
70	3	3	3	2	1	57.000	9.120
71	3	3	3	3	0	91.200	174.800
72	3	3	3	1	0	16.340	9.120
73	3	3	3	2	0	35.340	17.480
74	3	3	3	2	1	57.000	28.500
75	3	3	3	3	2	418.000	17.480
76	3	3	3	1	1	28.500	9.120
77	3	3	3	3	0	91.200	91.200
78	3	3	3	2	3	110.200	28.500
79	3	3	3	2	0	35.340	91.200
80	3	3	3	2	2	79.800	7.980

exame de alface, não funciona com especificidade satisfatória. Para esclarecimento adequado da questão, será necessária a pesquisa de coliformes mediante isolamento e identificação de bactérias que produzam gás nos tubos de LBVB.

b) Determinação de Escherichia coli.

A realização da prova completa para coliformes, descrita na secção precedente, partiu sempre de duas colônias isoladas de cada placa de EAM. A seleção dessas colônias ~~era~~ feita procurando-se tomar, de preferência, as que apresentavam características considerados típicos para Escherichia coli ou, na ausência de tais colônias, pelo menos as que tivessem os característicos descritos, originalmente por Levine (27) para as de coliformes. Entretanto, como já referido, frequentemente não se encontravam, nas placas de EAM, colônias cujo aspecto se conformasse às descrições; dessa maneira, em muitos casos foram tomadas colônias completamente atípicas.

Foram registrados separadamente os resultados que, para os exames de 80 lotes de alface, correspondiam às cêpas provenientes de colônias consideradas típicas de Escherichia coli. Esses resultados são apresentados no Quadro IX, onde também figuram os resultados da identificação de Escherichia coli para as mesmas cêpas.

A fim de se compararem os resultados da prova de identificação com os da prova de confirmação, tomando-se em conta as diferenças entre lotes, foi calculada a média geométrica dos quocientes de cada NMP da primeira prova pelo NMP correspondente da segunda. Essa média é 0,0312 e tem como limites fiduciais 0,0235 e 0,0413.

Conforme se verifica pelos resultados da análise, há grande diminuição dos NMP de Escherichia coli quando se passa, da consideração de colônias de aspecto típico nas placas de EAM, para a identificação final pelo VIC.

Esse fato revela a acentuada inespecificidade do aspecto das colônias em placas de EAM com relação à Escherichia coli, o que contraindicaria, na pesquisa desse germe na alface, o uso de tal método.

QUADRO IX

Determinação do número de Escherichia coli pela prova de confirmação em EAM e pela ulterior identificação das colônias isoladas

Lotes	Prova de confirmação em EAM					N.M.P. por 1g de fôlhas	Identificação pelo VIC					N.M.P. por 1g de fôlhas
	Número de replicatas positivas por volume (ml)						Número de replicatas positivas por volume (ml)					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
1	3	3	1	1	0	2.850	0	0	0	0	0	11,4
2	3	2	2	1	0	1.102	1	0	1	0	0	27,4
3	0	0	0	0	0	11,4	0	0	0	0	0	11,4
4	3	1	0	0	0	1.634	1	1	0	0	0	27,7
5	0	0	0	0	0	11,4	0	0	0	0	0	11,4
6	1	0	0	0	0	13,7	1	0	0	0	0	13,7
7	3	1	1	0	0	285	1	0	0	0	0	13,7
8	3	1	1	0	0	285	0	0	0	0	0	11,4
9	1	0	0	0	0	11,4	0	0	0	0	0	11,4
10	3	0	0	0	0	37,4	2	0	0	0	0	34,6
11	2	3	1	0	0	136,8	0	0	0	0	0	11,4
12	1	0	0	0	0	13,7	0	0	0	0	0	11,4
13	0	0	0	0	0	11,4	0	0	0	0	0	11,4
14	1	2	0	0	0	41,8	1	2	0	0	0	41,8
15	3	3	1	3	0	6.080	3	2	1	2	0	798
16	3	3	0	0	0	912	0	0	0	0	0	11,4
17	3	3	1	0	0	1.748	0	2	0	0	0	23,6
18	0	0	0	0	0	11,4	0	0	0	0	0	11,4
19	2	2	0	0	0	79,8	0	0	0	0	0	11,4
20	1	2	0	0	0	41,8	0	0	0	0	0	11,4
21	2	0	0	0	0	34,6	1	0	0	0	0	13,7
22	0	0	0	0	0	11,4	0	0	0	0	0	11,4
23	3	0	0	0	0	37,4	1	0	0	0	0	13,7
24	3	2	1	1	0	798	1	0	0	0	0	13,7
25	0	0	0	1	0	11,4	0	0	0	1	0	11,4
26	1	0	0	0	0	13,7	0	0	0	0	0	11,4
27	0	0	0	0	0	11,4	1	0	0	0	0	13,7
28	2	0	0	0	0	34,6	0	0	0	0	0	11,4
29	0	0	0	0	0	11,4	0	0	0	0	0	11,4

QUADRO IX (continuação)

Lotes	Prova de confirmação em EAM					Identificação pelo VIC						
	Número de replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg de fôlhas	Número de replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg de fôlhas
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
30	3	1	0	0	0	163,4	1	0	0	0	0	13,
31	2	1	1	0	0	76	1	0	0	0	0	13,
32	3	3	3	0	0	9.120	0	1	3	0	0	45,
33	0	2	0	0	0	23,7	0	1	0	0	0	11,
34	3	3	2	0	0	3.534	0	0	2	0	0	22,
35	3	2	1	0	0	570	1	1	0	0	0	27,
36	0	2	2	0	0	45,6	0	3	2	0	0	60,
37	2	3	2	0	0	167,2	1	2	1	0	0	57
38	0	2	0	0	1	23,7	0	3	0	1	0	49,
39	2	2	0	0	0	79,3	2	2	0	0	0	79,
40	3	3	1	0	0	1.748	2	2	1	0	0	106,
41	2	0	0	0	0	34,6	2	0	0	0	0	34,
42	0	0	0	0	0	11,4	0	0	0	0	0	11,
43	3	2	0	0	0	353,4-	3	3	0	0	0	912
44	0	0	0	0	0	11,4	0	2	0	0	0	23,
45	3	0	0	0	0	87,4	0	0	0	0	0	11,
46	3	1	0	0	0	163,4	2	2	0	0	0	79,
47	3	3	0	0	0	874	3	0	0	0	0	87,
48	0	0	0	0	0	11,4	0	0	0	0	0	11,
49	3	3	2	0	0	4.180	1	3	1	0	0	76
50	2	1	0	0	0	57	0	0	0	0	0	11,
51	3	0	1	0	0	148,2	2	1	0	0	0	57
52	2	0	0	0	0	34,6	1	0	0	0	0	13,
53	1	0	1	0	0	27,4	2	1	0	0	0	57
54	3	3	0	0	0	874	2	2	2	0	1	133
55	3	2	1	0	0	570	0	1	1	0	0	23,
56	2	0	0	0	0	34,6	3	0	0	0	0	87,
57	1	0	0	0	0	13,7	1	0	0	0	0	13,
58	3	2	2	2	2	13.300	0	0	0	0	0	11,

QUADRO IX (continuação)

Lotes	Prova de confirmação em EAM					N.M.P. por 1g de fôlhas	Identificação pelo VIC					N.M.P. por 1g de fôlhas
	Número de replicatas positivas por volume (ml)						Número de replicatas positivas por volume (ml)					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
59	2	1	2	0	0	102,6	0	0	0	0	0	11,4
60	2	3	2	0	0	167,2	0	0	0	0	0	11,4
61	2	1	0	0	0	57	2	1	0	0	0	57
62	3	1	1	0	0	235	0	0	0	0	0	11,4
63	3	3	2	1	0	5.700	0	0	0	1	0	11,4
64	0	1	0	0	0	11,4	0	0	0	0	0	11,4
65	3	1	1	0	0	235	0	0	0	0	0	11,4
66	3	3	1	0	0	1.748	1	0	0	0	0	13,7
67	2	3	2	0	0	167,2	2	2	0	0	0	79,8
68	2	3	0	0	0	110,2	0	1	0	0	0	11,4
69	3	2	2	0	0	79,8	0	0	0	0	0	11,4
70	3	3	0	0	0	87,4	2	1	0	0	0	57
71	3	3	2	0	0	4.130	2	3	2	0	0	167,2
72	2	0	0	0	0	34,6	2	0	0	0	0	34,6
73	3	3	0	0	0	87,4	0	1	0	0	0	11,4
74	3	3	2	0	0	4.130	2	0	1	0	1	53,2
75	1	2	0	0	0	41,8	2	1	0	0	0	57
76	1	2	2	0	0	76	2	2	2	0	0	133
77	3	0	0	0	0	87,4	3	0	0	0	0	87,4
78	3	1	0	0	0	163,4	1	0	0	0	0	13,4
79	3	3	1	0	0	1.748	2	2	1	0	0	106,4
80	2	2	0	0	0	79,8	0	0	0	0	0	11,4

Por outro lado, além de pouco específica, a caracterização de colônias de Escherichia coli pelo seu aspecto em placas de EAM é processo que, às vezes, se revela também pouco sensível para a evidência dessa bactéria. Assim, na série de exames considerada, foram identificadas 19 cêpas de Escherichia coli provenientes de colônias cujos característicos não se assemelham aos das colônias dessa bactéria.

Em virtude da inespecificidade mencionada, que se verificou desde os exames dos primeiros lotes de alface, decidiu-se investigar, na determinação quantitativa de Escherichia coli nessa hortaliça, a eficiência de outro método. Utilizamos, para esse fim, a inoculação de material enriquecido pela cultura de 24 horas em caldo lactosado, em meio LAB, o qual era então incubado durante 48 horas a 43° C; esse método, que foi desenvolvido por Vaughn e Levine (234) (235), apresenta consideráveis vantagens quanto à simplicidade de execução.

O processo foi adotado no exame de 40 lotes de alface, sempre seguido, nos casos em que a cultura em LAB desenvolvia gás após 24 ou 48 horas, de prova de confirmação mediante passagem dessa cultura em placas de EAM e de prova completa e identificação de Escherichia coli para as colônias isoladas dessas placas.

No Quadro X são apresentados os resultados da determinação de Escherichia coli nas duas fases do processo seguido, isto é, na fase inicial de cultura em LAB e na fase final de identificação das cêpas isoladas. Quando esses resultados diferiram para 24 e 48 horas de incubação da cultura em LAB, são eles apresentados separadamente.

Pode-se observar, nesse quadro, que para todos os lotes examinados sempre o NMP ou permanece igual ou diminui quando dos resultados da cultura de 24 ou de 48 horas em LAB, se passa a considerar aquelas da identificação obtida a partir dessa cultura após o mesmo período. A intensidade desse decréscimo exprime, naturalmente, o grau de inespecificidade do meio LAB. Em diversos casos, o prolongamento da incubação em LAB até 48 horas determinou o aparecimento de gás em alguns tubos a mais do que nas primeiras 24 horas. Conseqüentemente, conforme observado em alguns lotes, o NMP após identificação de culturas de 48 horas em

QUADRO X

Determinação do número de Escherichia coli por cultura em LAB e comparação com os resultados da identificação das colônias isoladas

Lotes	Cultura em LAB					E.M.P. por 1g de fôlhas	Identificação pelo VIC					N.M.P. por 1g de fôlhas	
	Leitura (horas)	Replicatas positivas por volume (ml)					Replicatas positivas por volume (ml)						
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴		10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴		10 ⁻⁵
41	24 e 48	2	0	0	0	0	34,6	2	0	0	0	0	34,6
42	24 e 48	2	1	0	0	0	57	2	1	0	0	0	57
43	24 e 48	3	3	0	0	0	874	3	3	0	0	0	874
44	24 e 48	3	1	0	0	0	163,4	3	1	0	0	0	163,4
45	24 e 48	3	0	0	0	0	87,4	3	0	0	0	0	87,4
46	24 e 48	1	0	0	0	0	13,7	1	0	0	0	0	13,7
47	24 e 48	3	3	0	0	0	874	3	3	0	0	0	874
48	24 e 48	1	0	0	0	0	13,7	1	0	0	0	0	13,7
49	24 e 48	3	3	3	0	0	8.740	3	3	3	0	0	8.740
50	24 e 48	0	1	0	0	0	11,4	0	1	0	0	0	11,4
51	24 e 48	3	0	0	0	0	87,4	3	0	0	0	0	87,4
52	24 e 48	3	0	0	0	0	87,4	3	0	0	0	0	87,4
53	24	3	2	2	0	0	798	2	1	1	0	0	76
	48	3	3	2	0	0	4.180	2	1	1	0	0	76
54	24 e 48	3	3	3	0	0	8.740	3	3	3	0	0	8.740
55	24 e 48	1	0	0	0	0	13,7	1	0	0	0	0	13,7
56	24 e 48	3	1	0	0	0	163,4	3	1	0	0	0	163,4
	24	3	3	0	0	0	874	3	3	0	0	0	874
57	48	3	3	1	0	0	1.634	3	3	0	0	0	874
	24	3	1	0	0	0	163,4	3	1	0	0	0	163,4
58	48	3	2	1	0	0	570	3	2	1	0	0	570
	24	3	3	2	0	0	3.534	3	2	2	0	0	798
59	48	3	3	2	1	0	5.700	3	2	2	1	0	1.102
	24	0	0	0	0	0	11,4	0	0	0	0	0	11,4
60	48	0	1	0	0	0	11,4	0	0	0	0	0	11,4
	24	3	1	1	2	0	570	2	1	1	0	0	76
61	48	3	3	3	3	0	91.200	2	1	1	0	0	76
	24	0	1	0	0	0	11,4	0	0	0	0	0	11,4
62	48	2	3	3	0	0	201,4	1	0	0	0	0	13,7

QUADRO X (continuação)

Lotes	Cultura em LAB						Identificação pelo VIC						
	Leitura (horas)	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de fôlhas	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.J. por 1 de fôll.
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
63	24	3	0	0	1	0	148,2	2	0	0	1	0	53,
	48	3	1	0	1	0	285	2	0	0	1	0	53,
64	24 e 48	0	2	0	0	0	23,6	0	1	0	0	0	11,
65	24	1	0	0	0	0	13,7	1	0	0	0	0	13,
	48	3	0	0	0	0	87,4	3	0	0	0	0	87,
66	24	3	0	0	0	0	87,4	3	0	0	0	0	87,
	48	3	1	0	0	0	163,4	3	0	0	0	0	87,
67	24	3	3	0	0	0	874	3	3	0	0	0	874
	48	3	3	0	0	1	1.432	3	3	0	0	0	874
68	24	3	3	0	0	0	874	3	3	0	0	0	874
	48	3	3	1	0	0	1.634	3	3	0	0	0	874
69	24 e 48	3	2	0	0	0	353,4	3	2	0	0	0	353,4
70	24	3	1	1	0	0	885	3	1	0	0	0	163,4
	48	3	2	1	0	0	570	3	1	0	0	0	163,4
71	24 e 48	3	3	2	0	0	3.534	3	3	2	0	0	3.934
72	24 e 48	2	0	0	0	0	34,6	2	0	0	0	0	34,6
73	24	2	0	0	0	0	34,6	2	0	0	0	0	34,6
	48	2	1	0	0	0	57	2	1	0	0	0	57
74	24	3	0	0	0	0	87,4	3	0	0	0	0	87,4
	48	3	0	2	0	1	243,2	3	0	2	0	1	243,2
75	24 e 48	3	1	0	0	0	163,4	3	1	0	0	0	163,4
76	24 e 48	3	3	3	0	0	8.740	3	3	3	0	0	8.740
77	24	3	0	0	0	0	87,4	3	0	0	0	0	87,4
	48	3	2	0	0	0	353,4	3	0	0	0	0	87,4
78	24 e 48	2	1	0	0	0	57	2	0	0	0	0	34,6
79	24 e 48	3	3	1	0	0	1.634	3	3	1	0	0	1.634
80	24 e 48	0	0	0	0	0	11,4	0	0	0	0	0	11,4

LAB pode tornar-se maior que o correspondente NMP das culturas de 24 horas, quando então esse aumento exprime a diminuição de sensibilidade no método que utiliza apenas a cultura em LAB, devida à redução do período de incubação nesse meio.

Para efeito de avaliação do processo, considera-se então o resultado da identificação das culturas positivas em LAB após 48 horas de incubação, como exprimindo o verdadeiro número de Escherichia coli em cada lote.

Os NMP obtidos da leitura em LAB após 24 horas, aparecem assim, às vezes menores, às vezes iguais e às vezes maiores que os correspondentes NMP verdadeiros. A média geométrica das razões dos primeiros para os NMP verdadeiros é 1,127, com limites fiduciais, para 95% de probabilidade, estimados em 0,9165 e 1,386. A diferença entre essas duas séries de NMP não é, portanto, significativa.

Os NMP obtidos da leitura em LAB após 48 horas são, como ficou dito, sempre iguais ou maiores que os NMP verdadeiros. No entanto, a maior parte dos valores correspondentes das duas séries são bastante próximos: 90 por cento dos quocientes dos primeiros valores pelos correspondentes NMP verdadeiros, são iguais ou inferiores a 4,044, valor este que tem limites fiduciais estimados em 1,870 e 55,01.

Na série de valores de NMP obtidos da leitura em LAB após 24 horas, quando se consideram apenas aqueles iguais ou maiores que os NMP verdadeiros, verifica-se que 90 por cento das razões dos primeiros para os correspondentes NMP verdadeiros, são iguais ou inferiores a 3,000 com limites fiduciais de 1,110 e 10,50.

A superposição dos limites fiduciais dos mesmos percentis correspondentes à incubação em LAB durante 48 horas e à incubação em LAB durante 24 horas, indica que tanto uma como a outra série de dados se aproximam igualmente dos valores considerados como verdadeiros.

Em resumo, da análise estatística dos dados apresentados no Quadro X, pode-se tirar as seguintes conclusões: a) os valores para a intensidade de contaminação por Escherichia coli em alface, quando determinados pelos resultados de cultura em LAB durante 24 horas, não di-

ferem significativamente daqueles obtidos após isolamento e identificação de cêpas provenientes da cultura; b) a identificação de cêpas de Escherichia coli, provenientes de culturas positivas em LAB, tanto após 24 horas como após 48 horas de incubação, revela certo grau de inespecificidade nos resultados obtidos por esta técnica; c) uma comparação entre os graus de inespecificidade das determinações de Escherichia coli por meio de culturas em LAB durante 24 e 48 horas, respectivamente, não indica discrepância significativa decorrente da diferença no período de incubação.

Pode-se, pois, concluir que embora não revele, a incubação em LAB durante 48 horas, maior inespecificidade que a incubação durante 24 horas, não ha vantagem aparente no prolongamento do período de incubação nêsse meio.

Foi calculada a correlação, para 40 lotes de alface, entre os logaritmos dos NMP de Escherichia coli obtidos pela identificação de colônias provenientes de cultura de 48 horas em LAB e os logaritmos dos NMP de coliformes obtidos pela prova completa. O coeficiente de correlação é 0,3855, valor êste que corresponde a uma probabilidade de aproximadamente 0,03 e pode assim ser considerado significativo.

(c) Determinação de enterococos

Para os 80 lotes de alface examinados, foram realizadas as provas de presunção em meio DA e de confirmação em meio AEV. Esta última era sempre seguida de identificação do germe, mediante verificação da pureza da cultura por exame microscópico e da capacidade de desenvolvimento em caldo hipertônico.

Os resultados dessas provas são apresentados no Quadro XI. Foram comparados os resultados finais com os da prova de presunção tomando-se em conta as diferenças entre lotes, para o que se calcularam os quocientes dos NMP finais pelos correspondentes NMP iniciais. A média geométrica dêsses quocientes é 0,0211, com limites fiduciais estimados em 0,0146 e 0,0334.

Houve, portanto, decréscimo estatisticamente significativo do número de enterocócos indicados pela prova de presunção, quando se

QUADRO XI

Determinação do número de enterococos pelas provas de presunção em DA o de confirmação em AEV seguida de identificação.

Lotes	Prova de presunção						Prova de confirmação e identificação					
	Número de replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg de fôlhas	Número de replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg de fôlhas
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
1	3	3	2	0	0	3.534	3	3	0	0	0	.912
2	3	3	3	0	0	9.120	3	3	1	0	0	1.634
3	3	3	0	0	0	.912	3	2	0	0	0	353,4
4	3	3	2	2	0	7.980	2	1	0	0	0	57
5	3	3	3	0	0	9.120	3	1	1	0	0	285
6	3	3	0	0	0	.912	3	3	0	0	0	912
7	3	3	1	0	0	1.634	1	2	0	0	0	418
8	3	3	3	3	1	174.800	3	2	1	0	0	570
9	3	3	3	0	0	9.120	2	0	1	0	0	53,2
10	3	3	2	0	0	3.534	2	0	1	0	0	53,2
11	3	3	3	1	0	16.340	2	1	0	0	0	285
12	3	3	3	2	0	35.340	3	2	0	0	0	353,4
13	3	3	3	2	1	57.000	3	2	1	0	0	570
14	3	3	3	3	1	174.800	3	1	0	0	0	163,4
15	3	3	3	0	0	9.120	2	0	0	0	0	34,6
16	3	3	1	0	0	1.634	1	0	0	0	0	13,7
17	3	3	1	0	0	1.634	3	0	0	0	0	87,4
18	3	3	3	2	0	35.340	1	1	0	0	0	27,7
19	3	2	3	0	0	1.102	1	1	0	0	0	27,7
20	3	3	0	0	0	.912	2	0	0	0	0	34,6
21	3	3	3	0	1	14.820	1	2	0	0	0	418
22	3	3	0	0	0	.912	3	1	0	0	0	163,4
23	3	3	3	2	1	57.000	2	1	1	0	0	76
24	3	3	1	0	0	912	3	0	0	0	0	87,4
25	3	3	0	0	0	.912	2	0	0	0	0	34,6
26	3	3	3	2	0	35.340	3	1	1	0	0	285
27	3	3	1	0	0	1.634	2	0	0	0	0	34,6
28	3	2	1	0	0	570	1	0	0	0	0	13,7
29	3	2	0	0	0	353	0	1	0	0	0	11,4

QUADRO XI (continuação)

Lotes	Prova de presunção						Prova de confirmação e identificação					
	Número de replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg de folhas	Número de replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por l de folha.
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
30	3	3	3	2	0	35.340	3	2	0	0	0	353,4
31	3	3	3	2	2	79.800	2	1	1	0	0	76
32	3	3	3	0	0	9.120	3	0	2	0	0	243,2
33	3	3	3	1	0	16.340	2	3	2	0	0	167,2
34	3	3	1	1	0	2.850	3	3	1	1	0	2.850
35	3	3	3	2	1	57.000	3	2	0	0	0	353,4
36	3	3	3	0	0	9.120	2	2	0	0	0	79,8
37	3	3	3	3	0	91.200	2	1	1	0	0	76
38	3	3	3	3	1	174.800	3	2	1	1	1	798
39	3	3	3	0	0	9.120	2	0	0	0	0	34,6
40	3	3	3	0	0	9.120	2	1	0	0	0	57
41	3	2	1	0	0	570	1	1	0	0	0	27,7
42	3	3	2	0	0	3.534	3	3	2	0	0	3.534
43	3	2	0	0	0	353	0	0	0	0	0	11,4
44	3	2	1	0	0	570	3	2	1	0	0	570
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	3	3	3	1	0	16.340	3	3	3	0	0	9.120
50	3	3	3	3	3	418.000	2	1	0	1	0	76
51	3	3	3	0	0	9.120	3	1	1	0	0	275
52	3	3	3	0	0	9.120	2	1	0	0	0	57
53	3	2	3	0	1	1.368	2	0	1	0	0	53,2
54	3	3	3	1	0	16.340	3	3	1	1	0	2.850
55	3	3	3	0	0	9.120	2	0	0	0	0	34,6
56	3	3	3	2	0	35.340	3	3	1	0	0	163,4
57	3	3	3	0	0	9.120	3	1	1	0	0	235
58	3	3	3	2	0	35.340	3	3	3	0	0	9.120

QUADRO XI (continuação)

Lotes	Prova de presunção						Prova de confirmação e identificação					
	Número de replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg do fôlhas	Número de replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg do fôlha
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
59	3	3	3	1	1	28.500	3	2	1	0	0	570
60	3	3	3	0	0	9.120	3	2	0	0	0	353,4
61	3	3	2	0	1	5.700	3	2	1	0	0	570
62	3	3	3	1	0	16.340	3	1	1	0	0	285
63	3	3	0	0	0	.912	3	1	0	0	0	163,4
64	3	3	1	0	0	1.634	3	0	0	0	0	874
65	3	3	1	0	0	1.634	1	1	0	0	0	27,7
66	3	3	2	1	0	5.700	3	0	0	0	0	87,4
67	3	3	3	1	0	16.340	2	2	0	0	0	79,8
68	3	3	3	2	0	35.340	3	2	3	0	0	1.102
69	3	3	3	1	1	28.500	3	2	1	0	0	570
70	3	3	3	3	0	91.200	1	2	1	0	0	57
71	3	3	3	2	1	57.000	3	1	0	0	0	163,4
72	3	3	0	0	0	.912	1	0	0	0	0	13,7
73	3	3	2	0	0	3.534	2	1	0	0	0	57
74	3	3	3	2	0	35.340	3	3	2	0	0	3.534
75	3	3	3	2	0	35.340	3	2	2	0	0	798
76	3	3	2	0	0	3.534	3	1	1	0	0	285
77	3	3	3	0	0	9.120	3	3	2	0	0	3.534
78	3	2	1	0	0	570	3	1	0	0	0	163,4
79	3	3	3	2	0	35.340	3	3	2	1	0	5.700
80	3	3	2	0	0	3.534	3	2	1	0	0	570

executaram provas mais específicas.

Dados não constantes do Quadro XI mostraram concordância quasi completa entre os resultados da prova de confirmação em AEV e da identificação mediante observação dos característicos morfológicos do germe e da sua capacidade de desenvolvimento em caldo hipertônico.

A fim de se poder avaliar esse processo de determinação de enterococos como índice de contaminação fecal da alface, procedeu-se a uma verificação do grau de correlação entre os valores por êle obtidos e aquêles resultantes da identificação de Escherichia coli nas culturas de 48 horas em LAB. O coeficiente de correlação obtido para os resultados correspondentes a 40 lotes de alface, foi 0,4036, valor êste significativo ao nível de probabilidade de aproximadamente 0,03.

(d) Pesquisa de Salmonelas

Dentre os 80 lotes de alface para os quais se procedeu à pesquisa de salmonelas, tendo-se examinado cêpas provenientes de mais de 5.000 colônias suspeitas, apenas 3 lotes se revelaram positivos. Dos três, foi isolada uma mesma espécie de salmonela, identificada como Salmonella derby.

Incidentalmente à pesquisa de salmonelas, de um outro lote de alface foi isolada uma cêpa que apresentou características bioquímicas do gênero Shigella, identificada posteriormente como Shigella alkalescens.

(e) Nível médio de contaminação da alface em São Paulo por bactérias de origem fecal.

Todos os lotes de alface examinados se revelaram contaminados por bactérias de origem fecal. Na quase totalidade dos lotes, uma tal contaminação foi verificada pela pesquisa tanto de coliformes, como de Escherichia coli ou de enterococos.

Em alguns lotes de alface foram mesmo encontrados graus de contaminação muito elevados. Assim, por exemplo, para 1 grama de fôlhas, em 5 lotes foi obtido um NMP de coliformes igual ou maior que 418.000; em 3 lotes, o NMP de Escherichia coli, após identificação de colônias isoladas, foi 8.740; e em 3 lotes o NMP de enterococos identi

ficados foi superior a 5.000.

As distribuições dos valores dos NMP por grama de fôlhas de alface podem ser caracterizadas pelas estimativas ~~abaco~~ discriminadas para coliformes, Escherichia coli e enterococos, feitas com os resultados dos diferentes métodos empregados.

Na determinação de coliformes pela prova completa, em 80 lotes a média aritmética dos NMP obtidos é 69,551; a média geométrica é 18.631, com limites fiduciais estimados em 10.942 e 31.717.

Uma vez que a distribuição dos NMP se aproxima da distribuição normal na escala logarítmica, nessa escala torna-se mais legítimo medir-se a dispersão dos valores: para os 80 lotes, o antiloga - ritmo do desvio-padrão da distribuição dos logarítmos dos NMP de coliformes determinados pela prova completa é 11,15, ou, como coeficiente de variação, 1015 por cento.

Pela prova de confirmação em LBVB, a média aritmética de 39 NMP de coliformes é 182.572; a média geométrica, 105.659, com limites fiduciais de 69.198 e 159.220. O coeficiente de variação é estimado em 275,5 por cento.

Na determinação de Escherichia coli mediante provas de confirmação em EAM em 80 lotes a média aritmética dos NMP obtidos é 849; a média geométrica, 130. Para os mesmos lotes, os NMP de Escherichia coli identificados pelo VIC têm como média aritmética 54, e, como média geométrica, 25.

Os NMP de Escherichia coli obtidos para 40 lotes, nas culturas de 24 horas em LAB, têm por média aritmética, 1.074 e, por média geométrica 164, esta com limites fiduciais de 89 e 302. O coeficiente de variação é 626,2 por cento.

Considerando-se as mesmas culturas ao fim de 48 horas de incubação, obtêm-se, para os NMP de Escherichia coli assim determinados, 3.572 como média aritmética e 272 como média geométrica, tendo esta última limites fiduciais de 139 e 531. O coeficiente de variação é 769,0 por cento.

A identificação das cêpas de Escherichias coli obtidas das

culturas de 48 horas em LAB, forneceu, para os mesmos 40 lotes de alface, a série de NMP considerada como exprimindo a verdadeira densidade das bactérias dessa espécie nesses lotes. A média aritmética dos NMP é 894; a média geométrica, 150, com limites fiduciais estimados em 82 e 276. Para a mesma série de dados, o coeficiente de variação é 617,8 por cento.

Na determinação de enterococos mediante a prova de presunção em DA, para 76 lotes a média aritmética dos NMP é 28.283; a média geométrica, 7.883, com limites fiduciais de 5.426 e 11.457; o coeficiente de variação é estimado em 427,6 por cento.

Na prova de confirmação em AEV seguida de identificação, os NMP de enterococos para os mesmos 76 lotes têm como média aritmética 770. A média geométrica da mesma série é 191, com limites fiduciais de 128 e 284. O coeficiente de variação é 487,5 por cento.

Capítulo IV

EFICIÊNCIA DE ALGUNS TRATAMENTOS NA REDUÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE ALFACE POR ESCHERICHIA COLI

I - LAVAGEM

a) Métodos - No estudo da eficiência da lavagem como método de remoção das bactérias de origem fecal contaminantes de alface, foi usada a cultura em IAB durante 24 horas, como método indicativo da densidade de Escherichia coli.

Dividiram-se as folhas de alface em duas porções; uma delas, correspondendo aproximadamente à metade do número de folhas, incluía as folhas mais externas; a outra porção incluía, em número aproximadamente igual ao primeiro, as folhas mais centrais.

Cada lote era constituído de 6 pés de alface, sendo usadas 5 folhas da metade externa e 5 da metade interna para a experiência de lavagem; igual número de folhas relacionadas da mesma maneira era usado como testemunha.

Foram examinados 21 lotes de alface. As folhas eram cuidadosamente lavadas em água corrente e submetidas à liquidificação com água tamponada a 4°C, na proporção, em peso, de uma parte de folhas para 2 de água.

De cada lote fizeram-se 2 exames, com 4 replicatas de 5 diferentes volumes.

b) Resultados - Os resultados das determinações do número de Escherichia coli são apresentados no Quadro XII para as folhas externas e no Quadro XIII para as folhas internas.

A fim de se avaliarem os resultados da lavagem, foram calculadas separadamente para a metade externa e para a metade interna; as médias geométricas dos quocientes dos NMP correspondentes às porções lavadas, pelos NMP correspondentes às porções do mesmo lote mantidas como testemunhos.

Para a metade externa, a média geométrica assim calculada é 0,0575, com limites fiduciais de 0,0210 e 0,1572.

Para a metade interna, a média geométrica é 0,0309, com limites fiduciais de 0,0066 e 0,1364.

Dessa maneira, tanto para as folhas da metade externa da alface, as quais revelaram, como era de se esperar, índices de contaminação muito mais elevados que as da metade interna, assim como para estas últimas, evidencia-se uma queda estatisticamente significativa dos NMP após a lavagem.

QUADRO XII

Efeito da lavagem em água corrente na redução do número de Escherichia coli nas 79 folhas da "metade" externa de alface

Lotes	Metade externa											
	"in natura"						lavada					
	Número de replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 100 g de folhas	Número de replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 100 do fôlh
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴		10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
1	4	4	4	1	0	140.400	4	4	4	2	0	24.16
	4	3	4	2	0	241.800	4	4	4	2	0	24.10
2	4	2	1	2	0	6.240	4	4	1	0	0	1.40
	4	2	2	2	0	7.800	2	4	1	1	0	1.13
3	3	1	1	0	0	819	2	1	1	0	0	5
	2	0	0	0	0	234	2	0	1	0	0	3
4	4	4	4	4	3	5.460.000	4	4	4	4	2	273.00
	4	4	4	4	0	936.000	4	4	4	4	2	273.00
5	4	4	3	2	2	128.700	4	4	4	4	3	546.00
	4	4	2	0	0	2.418	4	4	4	3	3	109.20
6	4	4	4	2	0	241.800	4	4	4	1	0	14.04
	4	4	4	2	0	241.800	4	4	4	2	4	81.90
7	4	1	0	0	0	1.404	4	2	1	1	0	50
	2	1	0	0	0	363	3	3	0	1	0	62
8	4	4	4	4	1	1.521.000	4	4	4	4	2	273.00
	4	4	4	2	0	241.800	4	4	4	4	2	273.00
9	4	4	2	1	0	36.660	4	4	2	0	0	2.410
	4	4	1	0	0	14.040	4	4	4	0	0	8.970
10	4	4	4	3	3	1.092.000	4	4	4	4	2	273.00
	4	4	4	3	0	429.000	4	4	4	4	1	152.10
11	4	4	4	4	2	2.730.000	4	4	4	3	0	42.90
	4	4	3	3	0	109.200	4	4	3	3	2	15.990

QUADRO XII (continuação)

Metade externa												
Lotes	"in natura"					N.M.P. por 100 g de fôlhas	lavada					N.M.P. por 100 g de fôlhas
	Número de replicatas positivas por volume (ml)						Número de replicatas positivas por volume (ml)					
	0 10	-1 10	-2 10	-3 10	-4 10		0 10	-1 10	-2 10	-3 10		
12	4	4	0	0	0	8.970	3	3	1	0	0	133
	4	3	1	1	0	858	3	4	2	0	0	195
13	4	4	2	0	0	24.180	4	4	4	1	2	31.590
	4	4	3	1	1	85.800	4	4	3	3	1	14.040
14	4	4	3	3	0	109.200	4	4	4	3	0	42.900
	4	4	3	4	0	140.400	4	4	4	4	2	273.000
15	4	4	3	2	0	85.800	4	4	4	2	1	36.660
	4	4	4	1	0	140.400	4	4	4	2	2	50.700
16	4	4	4	0	1	132.600	4	4	2	0	0	24.180
	4	4	2	0	0	24.180	4	3	3	0	0	1.092
17	4	4	3	0	0	42.900	4	4	3	1	0	6.240
	4	4	4	0	0	89.700	4	4	4	1	0	14.040
18	4	2	1	0	0	3.666	4	4	0	0	0	397
	4	2	0	0	0	2.418	3	4	2	1	0	3.666
19	4	4	0	1	0	13.260	4	4	4	4	1	152.100
	4	4	4	1	1	214.500	4	4	4	2	2	50.700
20	4	4	4	1	0	140.500	4	4	1	0	1	2.145
	4	4	2	2	0	50.500	4	4	3	0	0	4.290
21	4	4	3	0	0	42.900	4	4	4	2	1	36.660
	4	4	2	0	0	24.180	4	4	3	0	0	4.290

QUADRO XIII

Efeito de lavagem em água corrente na redução do número de Escherichia coli nas folhas de "metado" interna de alface.

Lotas	Metado interna										N.M.P. por 100 de fôlha	
	"in natura"					N.M.P. por 100 g de fôlhas	lavada					
	Número de replicatas positivas por volume (ml)						Número de replicatas positivas por volume (ml)					
	10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²		10 ⁻³
1	1	3	2	0	0	59,2	2	1	1	0	0	48,
	1	2	2	0	0	48	3	2	1	0	0	99,
2	4	4	2	2	0	481	1	2	1	0	0	40,
	1	0	2	0	0	28,9	0	1	3	0	0	33,
3	0	0	0	0	0	8,5	0	0	0	0	0	8,
	0	1	0	0	0	8,5	0	0	0	0	0	8,
4	4	4	4	4	2	259.000	4	4	4	2	0	22.940
	4	4	4	4	0	88.300	4	4	4	2	0	22.940
5	4	3	1	0	0	592	2	2	0	0	0	48
	4	4	1	0	0	1.332	4	2	0	0	0	229,
6	3	4	2	0	0	105	4	4	0	0	0	851
	3	4	2	1	0	218,3	3	3	2	1	0	177,
7	1	1	0	0	0	19,2	0	0	0	0	0	8,
	2	1	0	0	0	34,4	3	0	0	0	0	40,
8	4	4	4	1	0	13.320	4	4	1	0	0	1.332
	4	4	3	0	0	4.070	4	4	0	0	0	851
9	4	3	1	0	0	592	3	2	0	0	0	77,
	4	4	3	1	0	5.920	3	2	0	0	0	77,
10	4	4	4	1	1	80.350	3	4	2	1	0	218,
	4	4	4	2	1	34.780	4	4	3	1	0	5.920
11	4	4	4	4	3	518.000	4	4	4	3	1	59.200
	4	4	4	4	2	25.900	4	4	4	4	1	114.300

QUADRO XIII (continuação)

Lotes	Metade interna											
	"in natura"						lavada					
	Número de replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 100 g	Número de replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 100
	10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	de fôlhas	10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	de fôlhas
12	4	4	4	0	0	0.510	4	2	0	0	0	229
	4	2	0	0	0	229,4	4	1	0	0	0	19
13	4	3	2	1	0	1.036	1	1	0	1	0	29
	3	2	2	0	0	122	0	0	2	0	0	16
14	4	4	4	1	1	20.350	3	4	4	0	0	247
	4	4	4	2	1	34.700	3	4	2	1	0	218
15	4	4	3	0	0	4.070	4	4	1	0	0	1.332
	4	3	1	0	0	592	4	4	2	0	0	2.294
16	4	4	2	0	0	481	4	2	0	0	0	229
	4	1	0	0	0	133,2	4	2	1	0	0	347
17	3	0	0	0	0	40,7	1	0	0	0	0	9
	3	1	0	0	0	59,2	3	1	0	0	0	59
18	3	1	0	0	0	59,2	1	1	0	0	0	19
	2	0	0	0	0	22,2	0	0	0	0	0	0
19	3	4	3	1	0	247,9	2	3	1	0	0	74
	4	4	1	0	0	1.332	4	0	0	0	0	85
20	4	4	1	0	0	1.332	3	2	0	0	0	77
	4	4	1	0	0	1.332	4	3	0	0	0	407
21	4	2	2	0	0	481	2	0	0	0	0	22
	2	2	2	0	0	74	2	0	0	0	0	22

Verifica-se, assim, ter a lavagem reduzido a densidade de Escherichia coli nas fôlhas externas de alface de aproximadamente 94 por cento, e, a das fôlhas internas, de aproximadamente 97 por cento. Não é significativa a diferença entre essas duas percentagens de redução.

II - DESINFECÇÃO

a) Métodos - O método bacteriológico empregado foi o mesmo que aquêlo referido relação ao estudo do efeito da lavagem.

Os lotes de alface eram constituídos de 20 pés cada um. Selecionavam-se 10 fôlhas da porção mais externa de cada alface e com elas formavam-se 10 grupos, cada um contendo 20 fôlhas, uma de cada alface. A distribuição das fôlhas pelos diferentes grupos era feita num delineamento balanceado com relação aos tamanhos das alfacos e à ordem natural das fôlhas em cada pé.

Foi estudado o efeito de três agentes germicidas: iodo em solução aquosa contendo 50 partes por milhão (I); hipoclorito de sódio em solução contendo, de cloro, 50 partes por milhão (C); prata ionizável, mediante o uso de recipientes de barro impregnados eletroliticamente com esse metal na sua face interna (P).

Os grupos de fôlhas, contidos em cestas de arame, eram imersos nas soluções de I ou de C; para exame da ação oligodinâmica da prata, as fôlhas eram colocadas com água nos recipientes mencionados.

Após os diversos períodos de observação, cada grupo de fôlhas era mergulhado em recipientes para lavagem em água corrente durante 5 minutos.

Para cada um dos germicidas, foi experimentado o efeito do tratamento durante 3 períodos de tempo diferentes: 40, 80 e 120 minutos, respectivamente.

Para cada lote, um grupo de fôlhas testemunhas era examinado depois de mantido em recipiente com água durante 40 minutos.

Cada dia eram examinados 10 grupos de fôlhas provenientes de um mesmo lote. Em 20 dias diferentes examinaram-se 20 lotes e atribuíram-se tratamentos diversos a grupos constituídos de maneira semelhante, tendo o conjunto das experiências sido delineado conforme um duplo quadrado latino.

b) Resultados - Numa experiência preliminar foi investigado, em 32 lotes de alface, com exames em duplicata, o efeito da imersão em água durante 40 minutos. São apresentados no Quadro XIV os NMP correspondentes aos exames dos grupos de fôlhas imersas e dos de fôlhas testemunhas.

QUADRO XIII A

Constituição dos grupos de fôlhas de alface em cada lote*

ALFACES	Grupos de fôlhas									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1 e 20	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2 e 19	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
3 e 18	6	1	7	2	8	3	9	4	10	5
4 e 17	5	10	4	9	3	8	2	7	1	6
5 e 16	4	3	1	5	9	2	6	10	3	7
6 e 15	7	3	10	6	2	9	5	1	8	4
7 e 14	8	5	9	1	7	4	10	2	6	3
8 e 13	3	6	2	10	4	7	1	9	5	8
9 e 12	9	4	5	8	1	10	3	6	7	2
10 e 11	2	7	6	3	10	1	8	5	4	9

* - As alfaces são numeradas de 1 a 20 pela ordem decrescente de tamanho; a numeração das fôlhas, de 1 a 10, segue a ordem natural, de fora para dentro.

QUADRO XIII B

Delimitamento em quadrado latino para o estudo da desinfecção

DIA (Lote)	Grupo									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1 ou 11	C	F	B	J	D	G	A	I	E	H
5 ou 12	D	H	A	E	I	B	F	J	C	G
3 ou 13	E	J	D	I	C	H	B	G	A	F
4 ou 14	F	A	G	B	H	C	I	D	J	E
5 ou 15	I	D	E	H	A	J	C	F	G	B
6 ou 16	H	E	I	A	G	D	J	B	F	C
7 ou 17	J	I	H	G	F	E	D	C	B	A
8 ou 18	G	C	J	F	E	I	E	A	H	D
9 ou 19	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
10 ou 20	B	G	F	C	J	A	H	E	D	I

- A = C₄₀ ; B = I₈₀ ; C = P₈₀ ; D = P₄₀ ; E = I₄₀ ;

F = C₁₂₀ ; G = P₁₂₀ ; H = Test. ; I = I₁₂₀ ; J = C₈₀ .

QUADRO XIV

Comparação entre os N.M.P. de Escherichia coli determinados para fôlhas de alface imersas em água durante 40 minutos e para fôlhas não imersas.

Lote	N.M.P. por lg de fôlhas		Lote	N.M.P. por lg de fôlhas	
	não imersas	imersas 40 minutos		não imersas	imersas 40 minutos
1	55	62	17	110	230
	21	28		62	23
2	220	940	18	94	620
	620	230		41	110
3	360	94	19	23	62
	110	28		36	110
4	160	36	20	550	36.000
	550	250		160	2.300
5	110	11	21	3.600	3.600
	220	9,1		2.300	3.600
6	34	6	22	3.400	1.600
	40	28		2.300	3.600
7	94	5,2	23	3.400	620
	21	2,3		3.600	940
8	160	62	24	1.100	2.300
	110	280		360	3.600
9	1.100	2.300	25	220	360
	230	360		620	2.300
10	50	550	26	3.600	3.200
	230	620		11.000	620
11	220	620	27	3.600	6.200
	62	360		3.600	11.000
12	160	55	28	1.100	1.100
	230	62		620	2.300
13	94	110	29	140.000	14.000
	2.800	940		13.000	14.000
14	11	36	30	16.000	2.200
	8	62		11.000	1.600
15	62	110	31	94	360
	62	62		110	360
16	55	110	32	1.300	2.800
	27	55		6.200	6.200

A análise estatística desses resultados indica não serem significativas as diferenças entre as duas séries de dados. Conseqüentemente, uma vez que a imersão em água durante 40 minutos não afeta de maneira apreciável o teor de Escherichia coli nas folhas de alface, justifica-se a adoção dessa técnica para termo de comparação na avaliação do efeito dos tratamentos germicidas.

Os resultados da experiência com os agentes germicidas são apresentados no Quadro XV.

Para avaliação estatística desses resultados, foi feita inicialmente uma análise de variância, na qual se verificou ser significativa, ao nível de probabilidade de 0,05, a diferença entre tratamentos. Em seguida, o efeito de cada um dos germicidas foi comparado, independentemente do tempo de tratamento, com o correspondente testemunha.

Resultou dessa análise, ser significativa a queda nos NMP observada, com relação ao testemunha, para os tratamentos por cloro e por iodo. Não foi significativo o efeito da prata.

Prosseguindo-se na análise estatística dos resultados considerados, calcularam-se, para cada germicida, curvas de desinfecção relacionando a percentagem de sobrevivência de Escherichia coli após o tratamento com o tempo de duração deste. Essas curvas, que são representadas na figura 3, têm as seguintes equações, nas quais Y representa a percentagem de sobrevivência e t o tempo de desinfecção.

Para o iodo:

$$Y = (0,9875) \cdot 10^{-0,0055t}$$

Para o cloro:

$$Y = (0,9891) \cdot 10^{-0,0048t}$$

Para a prata:

$$Y = (0,9999) \cdot 10^{-0,00013t}$$

Verifica-se, conforme essas curvas, terem sido muito semelhantes os efeitos germicidas, para Escherichia coli na alface, do cloro e do iodo, respectivamente. Por outro lado, é negligível o efeito da prata.

Após os diferentes períodos de ação dos três germicidas estudados, as médias estimadas para as percentagens de redução no grau de contaminação da alface por Escherichia coli são as seguintes:

Após 40 minutos; iodo - 39,74; cloro - 35,73; prata - 1,19.

Após 80 minutos; iodo - 63,69; cloro - 58,69; prata - 2,35.

Após 120 minutos; iodo - 78,12; cloro - 73,45; prata - 3,52.

CURVAS DE DESINFECÇÃO DE ESCHERICHIA COLI EM ALFACE

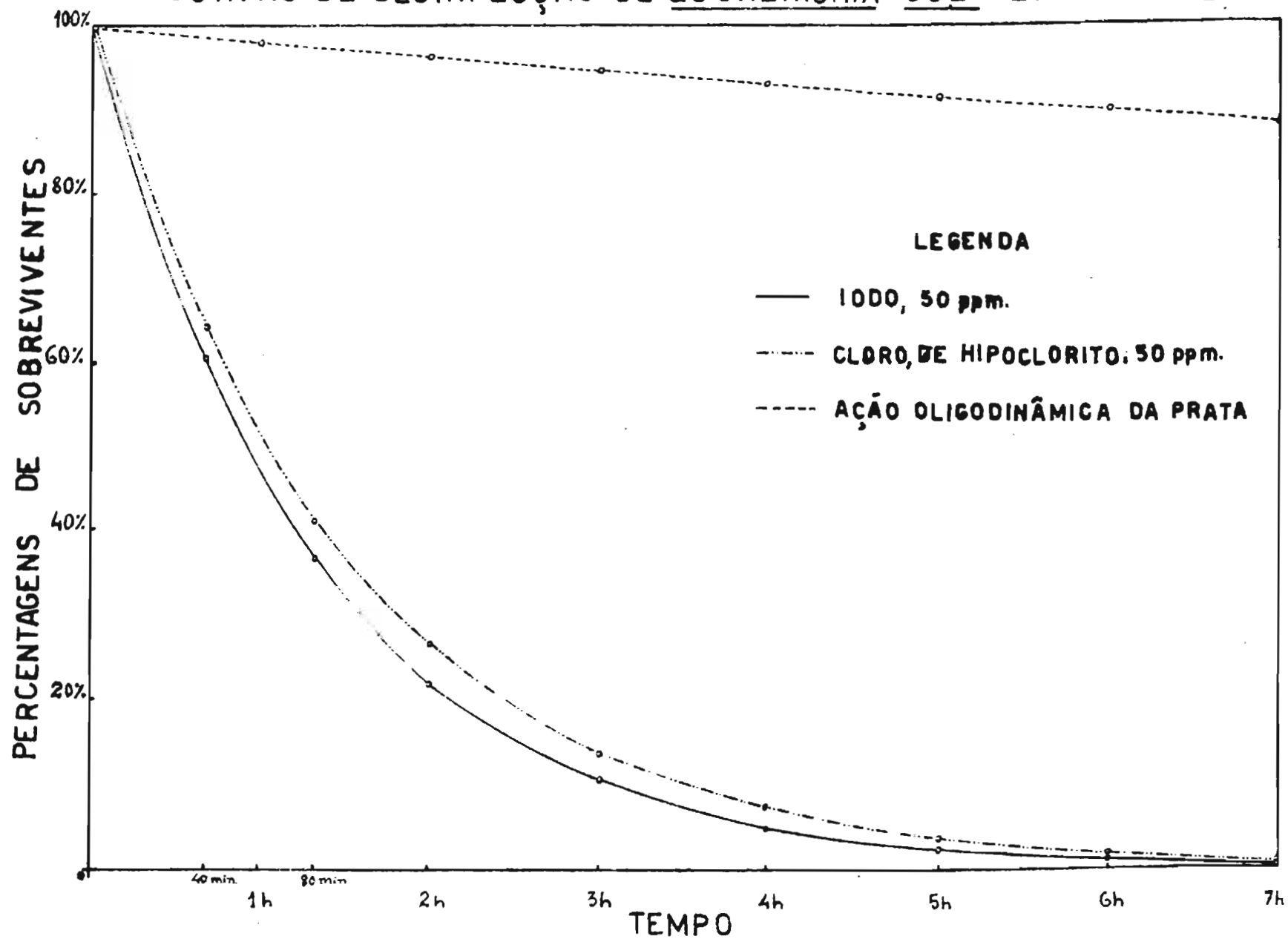


FIG. 3

QUADRO XV

DETERMINAÇÃO DOS N.M.P; DE ESCHERICHIA COLI EM DIFERENTES LOTES DE FOLHAS DE ALFACE, SUBMETIDOS À AÇÃO DE TRÊS AGENTES GERMICIDAS DURANTE TRÊS PERÍODOS DE TEMPO.

Lote 1							Lote 2						
Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg de folhas	Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg de folhas
	10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
T	3	0	0	0	0	41,8	T	4	1	1	0	0	209
	3	1	0	0	0	60,8		4	1	1	0	0	209
I ₄₀	4	4	1	0	0	1.368	I ₄₀	4	4	1	0	0	1.368
	4	3	0	0	0	418		4	4	0	0	0	874
C ₄₀	3	0	0	0	0	41,8	C ₄₀	4	3	0	0	0	418
	1	1	0	0	0	39,8		4	2	1	0	0	357,2
P ₄₀	3	2	0	0	0	79,8	P ₄₀	4	4	2	0	0	2.356
	3	1	2	0	0	98,8		4	3	0	0	0	418
I ₈₀	1	0	0	0	0	9,9	I ₈₀	3	3	3	0	0	182,4
	0	1	0	0	0	8,7		2	2	2	0	0	76
C ₈₀	1	0	0	0	0	9,9	C ₈₀	4	0	0	0	0	87,4
	2	1	0	0	0	35,3		4	1	0	0	0	136,8
P ₈₀	4	3	0	0	0	418	P ₈₀	4	2	1	0	0	357,2
	4	3	1	1	0	836		4	3	0	0	0	418
I ₁₂₀	1	1	0	0	0	19,8	I ₁₂₀	3	1	0	0	0	60,8
	2	0	0	0	0	22,8		3	3	0	0	0	106,4
C ₁₂₀	1	1	0	0	0	19,8	C ₁₂₀	4	4	3	0	0	4.180
	1	0	0	0	0	9,9		4	4	2	0	0	2.356
P ₁₂₀	4	2	1	0	0	357,2	P ₁₂₀	4	4	0	0	0	874
	4	2	0	0	0	235,6		4	4	1	0	0	1.368

QADRO XV (continuação)

Lote 3						Lote 4							
Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de folhas	Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de folhas
	10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
T	4	1	0	0	0	136,8	T	3	0	0	0	0	41,8
	3	0	0	0	0	41,8		1	1	0	0	0	19,8
I ₄₀	4	1	1	0	0	209,4	I ₄₀	0	0	0	0	0	<8,7
	4	2	0	0	0	235,6		0	0	0	0	0	<8,7
C ₄₀	3	0	0	0	0	41,8	C ₄₀	0	0	0	0	0	<8,7
	3	2	0	0	0	79,8		0	0	0	0	0	<8,7
P ₄₀	3	0	1	0	0	60,8	P ₄₀	1	2	1	0	0	41,8
	2	3	1	0	0	76		1	0	0	0	0	9,9
I ₈₀	2	2	0	0	0	49,4	I ₈₀	0	0	0	0	0	<8,7
	4	0	0	0	0	87,4		1	0	0	0	0	9,9
C ₈₀	2	2	1	0	0	60,8	C ₈₀	3	1	0	0	0	60,8
	1	0	0	0	0	9,9		1	0	0	0	0	9,9
P ₈₀	3	0	0	0	0	41,8	P ₈₀	4	3	0	0	0	41,8
	3	0	1	0	0	60,8		4	3	0	0	0	41,8
I ₁₂₀	2	2	0	0	0	49,4	I ₁₂₀	0	0	0	0	0	<8,7
	2	0	0	0	0	22,8		0	1	0	0	0	8,7
C ₁₂₀	3	2	1	0	0	102,6	C ₁₂₀	1	0	0	0	0	9,9
	3	1	0	0	0	60,8		2	0	1	0	0	34,6
P ₁₂₀	3	1	0	0	0	60,8	P ₁₂₀	2	2	0	0	0	49,4
	2	2	0	0	0	49,4		3	1	0	0	0	60,8

QDRO XV (continuação)

Lote 5						Lote 6							
Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de folhas	Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de folhas
	10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
T	4	3	3	0	0	1.064 49,4	T	4	4	2	0	0	2.356 136,8
	2	2	0	0	0			4	1	0	0	0	
I ₄₀	1	1	0	0	0	18,8 9,9	I ₄₀	4	4	3	0	0	4.180 190
	1	0	0	0	0			3	4	2	0	0	
C ₄₀	3	1	0	0	0	60,8 9,9	C ₄₀	4	3	3	0	0	1.064 30,4
	1	0	0	0	0			1	2	0	0	0	
P ₄₀	4	3	3	0	0	1.064 357,2	P ₄₀	4	4	4	1	0	13.680 874
	4	2	1	0	0			4	4	0	0	0	
I ₈₀	1	0	0	0	0	9,9 64,6	I ₈₀	3	2	0	0	0	79,8 79,8
	2	3	0	0	0			3	1	0	0	0	
C ₈₀	3	1	0	0	0	60,8 60,8	C ₈₀	3	1	0	0	0	60,8 874
	3	1	0	0	0			4	4	0	0	0	
P ₈₀	3	1	0	0	0	60,8 76	P ₈₀	4	3	3	1	0	129,2 60,8
	3	0	2	0	0			3	1	0	0	0	
I ₁₂₀	1	0	0	0	0	9,9 9,9	I ₁₂₀	0	2	0	0	0	17,5 8,7
	1	0	0	0	0			0	0	0	0	0	
C ₁₂₀	1	1	0	0	0	19,8 418	C ₁₂₀	4	4	1	0	0	1.638 49,4
	4	3	0	0	0			2	2	0	0	0	
P ₁₂₀	1	2	1	0	0	41,8 35,3	P ₁₂₀	0	1	0	0	0	8,7 35,3
	2	1	0	0	0			2	1	0	0	0	

QUADRO XV (continuação)

Lote 7						Lote 8							
Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de folhas	Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de folhas
	10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
T	0	0	0	0	0	< 8,7	T	4	4	2	0	0	2.356
	0	0	0	0	0	< 8,7		4	4	1	0	0	1.368
I ₄₀	2	1	0	0	0	35,3	I ₄₀	4	4	3	1	0	6.080
	1	1	0	0	0	19,8		4	3	0	0	0	418
C ₄₀	1	0	0	0	0	9,9	C ₄₀	4	4	1	0	0	1.368
	0	0	0	0	0	< 8,7		4	4	2	0	0	2.356
P ₄₀	0	0	0	0	0	< 8,7	P ₄₀	4	4	1	0	0	1.368
	0	0	0	0	0	< 8,7		4	4	1	0	0	1.368
I ₈₀	0	2	0	0	0	17,5	I ₈₀	4	0	0	0	0	874
	2	1	0	0	0	35,3		4	4	3	0	0	4.180
C ₈₀	0	0	0	0	0	< 8,7	C ₈₀	4	1	0	0	0	136,8
	1	0	0	0	0	9,9		4	4	2	0	0	2.356
P ₈₀	0	1	0	0	0	8,7	P ₈₀	4	4	3	2	0	8.360
	0	0	0	0	0	< 8,7		4	4	1	3	0	4.180
I ₁₂₀	3	0	0	0	0	41,8	I ₁₂₀	2	0	0	0	0	22,8
	3	0	1	0	0	60,8		1	0	0	0	0	8,7
C ₁₂₀	0	1	0	0	0	8,7	C ₁₂₀	2	0	0	0	0	22,8
	1	0	0	0	0	9,9		3	2	0	0	0	79,8
P ₁₂₀	0	0	0	0	0	< 8,7	P ₁₂₀	4	4	1	1	0	2.090
	1	0	0	0	0	9,9		4	4	1	0	0	1.368

QUADRO XV (continuação)

Lote 9							Lote 10						
Condição	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg de folhas	Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg de folhas
	10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
T	4	4	4	4	1	148.200	T	4	4	2	0	0	4.180
	4	4	4	0	0	91.200		4	4	1	0	0	1.368
I ₄₀	4	4	4	3	3	106.400	I ₄₀	4	3	2	1	0	1.064
	4	4	4	4	0	91.200		4	3	2	0	0	836
C ₄₀	4	4	4	1	0	13.680	C ₄₀	3	2	0	0	0	79,8
	4	4	4	1	0	13.680		4	1	0	0	0	136,8
P ₄₀	4	4	3	2	0	8.360	P ₄₀	4	4	3	0	0	4.180
	4	4	3	1	0	6.080		4	4	0	1	0	1.292
I ₈₀	4	4	2	0	2	3.572	I ₈₀	4	2	0	0	0	235,6
	4	4	4	1	0	13.680		4	4	2	0	0	2.356
C ₈₀	4	4	3	1	0	6.080	C ₈₀	3	2	1	0	0	102,6
	4	4	4	2	0	23.560		3	1	0	0	0	60,8
P ₈₀	4	4	4	4	2	266.000	P ₈₀	4	4	4	0	0	8.740
	4	4	4	4	2	266.000		4	4	3	0	0	4.180
120	4	4	3	0	0	4.180	I ₁₂₀	4	3	0	0	0	418
	4	4	4	0	1	1.292		4	4	2	0	0	2.356
120	4	4	3	0	0	4.180	C ₁₂₀	4	1	0	0	0	136,8
	4	4	3	1	0	6.080		4	3	0	0	0	418
20	4	4	4	2	1	3.572	P ₁₂₀	4	4	0	1	1	1.900
	4	4	4	4	0	91.200		4	4	0	1	0	1.292

QUADRO XV (continuação)

Lote 11						Lote 12							
Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de folhas	Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de folhas
	10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
T	4	4	4	0	0	3.740	T	4	4	3	0	0	4.100
	4	4	4	1	0	13.680		4	4	1	2	0	3.078
I ₄₀	4	1	0	1	0	.209	I ₄₀	4	4	3	2	0	8.360
	4	4	2	0	0	2.356		4	4	1	0	0	1.368
C ₄₀	4	3	3	1	0	1.368	C ₄₀	4	4	4	1	0	13.680
	4	4	2	0	0	2.356		4	4	4	1	0	13.680
P ₄₀	4	4	2	1	0	3.572	P ₄₀	4	4	4	2	0	23.560
	4	4	2	3	0	6.460		4	4	2	0	0	235,6
I ₈₀	4	1	0	0	0	136,8	I ₈₀	4	4	4	1	0	13.680
	4	2	1	0	0	357,2		4	3	2	0	0	836
C ₈₀	4	3	3	0	0	1.064	C ₈₀	4	4	4	2	0	23.560
	4	1	0	0	0	136,8		4	4	4	1	1	20.900
P ₈₀	4	3	0	0	0	418	P ₈₀	4	4	0	0	0	.374
	4	4	0	0	0	874		4	3	2	3	0	1.520
I ₁₂₀	4	4	1	0	0	1.368	I ₁₂₀	4	1	0	0	0	136,8
	4	4	3	0	0	4.100		4	3	0	0	0	418
C ₁₂₀	4	1	1	0	0	209	C ₁₂₀	4	4	4	1	2	30.700
	4	4	0	0	0	874		4	4	3	0	0	4.100
P ₁₂₀	4	4	2	0	0	2.356	P ₁₂₀	4	4	2	1	1	4.940
	4	4	3	0	0	4.100		4	4	2	1	1	4.940

QUADRO XV (continuação)

Lote 13						Lote 14							
Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de folhas	Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de folhas
	10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
T	4	4	1	0	0	1.368	T	4	4	4	1	2	30.780
	4	4	2	0	0	2.356		4	4	3	3	2	15.580
I ₄₀	4	4	1	0	0	209	I ₄₀	4	4	4	4	2	266.000
	4	2	0	0	0	235,6		4	4	4	4	3	532.000
C ₄₀	4	2	0	0	0	235,6	C ₄₀	4	4	3	3	0	6.080
	2	4	1	0	0	95		4	4	3	3	2	15.580
P ₄₀	4	4	2	1	1	4.940	P ₄₀	4	4	4	4	4	532.000
	4	4	4	1	0	13.680		4	4	4	2	2	49.400
I ₈₀	4	2	0	0	0	235,6	I ₈₀	4	4	1	0	0	1.368
	4	3	0	0	0	418		4	4	4	1	1	20.900
C ₈₀	4	2	2	0	0	494	C ₈₀	4	4	3	1	0	6.080
	4	4	2	0	0	2.356		4	4	4	1	0	13.680
P ₈₀	4	4	3	1	0	6.080	P ₈₀	4	4	4	1	0	13.680
	4	4	2	0	0	2.356		4	4	3	0	0	4.180
I ₁₂₀	4	3	2	1	1	1.254	I ₁₂₀	4	4	2	1	0	3.572
	4	4	2	0	0	2.356		4	4	2	2	0	4.940
C ₁₂₀	4	4	2	0	0	2.356	C ₁₂₀	4	4	1	3	3	7.220
	4	2	0	0	0	235,6		4	4	3	4	1	16.340
P ₁₂₀	4	4	0	0	0	874	P ₁₂₀	4	4	4	2	0	23.560
	4	4	1	0	0	1.368		4	4	3	1	0	6.080

QUADRO XV (continuação)

Lote 15						Lote 16							
Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg de folhas	Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg de folhas
	10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
T	4	4	2	1	0	3.572	T	4	3	0	1	0	608
	4	4	4	1	0	13.680		4	3	1	0	0	608
I ₄₀	4	4	0	0	0	874	I ₄₀	4	2	2	0	0	494
	4	3	1	0	0	608		4	2	1	0	0	357,2
C ₄₀	4	4	3	0	0	4.180	C ₄₀	4	2	0	0	0	235,6
	4	3	0	0	0	418		4	2	0	0	0	235,6
P ₄₀	4	4	2	2	0	4.940	P ₄₀	4	4	0	0	0	874
	4	4	3	0	0	4.180		4	4	0	0	0	874
I ₃₀	4	4	1	1	0	2.090	I ₃₀	4	3	3	0	0	1.064
	4	3	2	1	1	1.254		4	2	0	0	0	235,6
C ₃₀	4	3	1	0	0	608	C ₃₀	4	2	0	0	0	235,6
	4	2	1	1	0	494		4	2	0	0	0	874
P ₃₀	4	4	4	2	0	23.560	P ₃₀	4	4	0	1	0	1.292
	4	4	3	0	0	4.180		4	4	0	0	0	874
I ₁₂₀	4	4	4	1	0	13.680	I ₁₂₀	4	4	3	0	0	4.180
	4	4	1	1	0	2.090		4	3	1	1	0	836
C ₁₂₀	4	4	0	0	0	874	C ₁₂₀	4	3	1	2	0	99
	4	2	0	0	0	235,6		4	4	0	0	0	874
P ₁₂₀	4	4	3	1	0	6.080	P ₁₂₀	4	4	2	0	0	2.356
	4	2	2	1	0	616		4	4	2	0	0	2.356

QUADRO XV (continuação)

Lote 17						Lote 18							
Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de folhas	Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por 1g de folhas
	10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
T	2	1	0	0	0	35,3	T	4	4	1	0	0	1.368
	4	1	2	0	0	307,8		4	4	2	1	0	3.572
I ₄₀	3	2	0	0	0	79,8	I ₄₀	4	3	2	0	0	836
	2	0	0	0	0	22,8		4	3	0	0	0	418
C ₄₀	0	0	0	0	0	< 8,7	C ₄₀	4	4	2	0	0	4.940
	0	0	0	0	0	< 8,7		4	4	0	0	1	129
P ₄₀	3	0	0	0	0	41,8	P ₄₀	4	4	3	1	0	6.030
	3	1	2	0	0	98,8		4	4	3	0	0	4.130
I ₈₀	0	1	0	0	0	8,7	I ₈₀	4	4	4	2	0	23.560
	1	0	0	0	0	9,9		4	4	3	0	0	4.180
C ₈₀	4	2	0	0	0	235,6	C ₈₀	4	4	4	1	0	13.680
	3	1	0	0	0	60,8		4	4	2	2	0	4.940
P ₈₀	4	3	0	0	0	418	P ₈₀	4	4	3	2	1	10.640
	4	2	1	0	0	357,2		4	4	4	1	0	13.680
I ₁₂₀	1	0	0	0	0	9,9	I ₁₂₀	4	4	1	1	0	2.090
	1	0	0	0	0	9,9		4	4	0	0	0	874
C ₁₂₀	4	3	0	0	0	418	C ₁₂₀	4	4	2	0	0	2.356
	1	0	0	0	0	9,9		4	4	3	0	0	4.180
P ₁₂₀	4	0	0	0	0	87,4	P ₁₂₀	4	4	2	0	0	2.356
	0	1	1	0	0	17,5		4	4	3	0	0	4.180

QUADRO XV (continuação)

Lote 19						Lote 20							
Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg de folhas	Tratamento	Replicatas positivas por volume (ml)					N.M.P. por lg de folhas
	10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			10	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
T	4	4	2	2	1	6.460	T	4	3	0	0	0	418
	4	4	3	2	2	12.540		4	3	0	0	0	418
I ₄₀	4	4	4	2	0	23.560	I ₄₀	4	4	1	0	0	1.368
	4	4	0	0	0	374		4	1	0	0	0	136,8
C ₄₀	4	3	3	1	0	1.292	C ₄₀	4	4	1	0	0	1.368
	4	4	2	3	0	6.460		4	2	0	0	0	235,6
P ₄₀	4	3	2	2	0	1.254	P ₄₀	4	2	1	0	0	357,2
	4	4	2	0	0	2.356		4	3	0	1	0	608
I ₈₀	4	4	4	2	0	23.560	I ₈₀	3	2	0	0	0	79,8
	4	4	1	0	0	1.368		2	0	0	0	0	22,8
C ₈₀	4	4	3	0	0	4.180	C ₈₀	4	4	0	1	0	129,2
	4	3	0	2	0	836		4	4	1	0	0	1.368
P ₈₀	4	4	4	2	0	23.560	P ₈₀	4	2	0	0	0	235,6
	4	4	1	0	0	1.368		4	2	1	0	0	357,2
I ₁₂₀	4	4	1	1	1	3.078	I ₁₂₀	1	3	2	0	0	60,8
	4	2	2	0	0	494		2	0	0	0	0	22,8
C ₁₂₀	4	1	3	2	0	608	C ₁₂₀	2	2	0	0	0	49,4
	4	3	1	0	0	418		2	2	0	0	0	49,4
P ₁₂₀	4	4	4	1	0	13.680	P ₁₂₀	4	3	3	0	0	1.064
	4	3	3	2	0	1.558		4	1	0	0	0	136,8

Foram ainda estimados os períodos de tempo necessários para a redução da densidade de Escherichia coli a 1 por cento da dos testemunhas. Para o iodo, esse período é de 6 horas e 3 minutos, com limites fiduciais, para 95% de probabilidade, estimados em 5 h, 31 min. e 6 h 43 min. Para o cloro, o período mais provável é de 6 h 56 min., com limites fiduciais de 6 h 13 min. e 7 h 49 min. Para a prata, o período mais provável é de 10 dias e 16 horas; o limite difucial inferior é de 4 dias e 2 horas, ao passo que o superior estende-se para o infinito.

Capítulo V
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A transmissão, tanto de infestações como de infecções, através da ingestão de hortaliças cruas tem sido verificada epidemiologicamente. Porém, a literatura sobre essa ocorrência não é extensa. Os casos dessa ordem têm se verificado mais frequentemente em relação às parasitoses intestinais, o que é facilmente explicável pela grande resistência dos ovos de helmintos às condições desfavoráveis que podem ser encontradas no meio exterior.

Dentre as helmintíases cuja transmissão tem sido observada pelo mecanismo discutido, sobressai aquela devida ao Ascaris lumbricoides. Na primeira parte do presente estudo, várias investigações sobre a extraordinária resistência dos ovos desse helminto, tanto a agentes físicos como a agentes químicos, foram citadas.

Ainda entre as moléstias parasitárias, também as protozooses intestinais são apresentadas como facilmente dissemináveis por essa via, e entre elas, adquire especial importância a amebíase.

A resistência dos cistos dos protozoários aos fatores desfavoráveis que operam naturalmente no meio exterior, é reconhecida mente maior do que a das bactérias e vírus. A capacidade de sobrevivência dos últimos, é, no entanto, suficiente para a sua transmissão poder se operar através de hortaliças contaminadas.

Esses pontos também foram suficientemente demonstrados pelos estudos citados a respeito da sobrevivência de bactérias, quer nos esgotos ou na água, quer no solo e nos vegetais.

Isolamentos de bactérias patogênicas intestinais têm sido feitos a partir de vegetais irrigados com água contaminada. Evidência epidemiológica bastante forte da transmissão de infecções através de vegetais contaminados, tanto a homens como a animais também tem sido apresentada.

Mesmo entre nós, epidemias dessa origem têm sido descritas, como aquela que atingiu, em 1944, zona do Recife habitada por classe sócio-economicamente acima da média. Em 1949 foi publicado o estudo epidemiológico rigoroso, realizado por ocasião da epidemia pe-

lo Diretor Geral do Departamento de Saúde Pública do Estado de Pernambuco, Dr. Celso Caldas. A única conclusão que o autor pôde alcançar da análise dos dados do inquérito foi a de que a epidemia, que atingira 171 pessoas e provocara 23 óbitos, fôra disseminada através do consumo de hortaliças irrigadas e lavadas em água altamente contaminada.

Parece, portanto, não haver duvida sobre a capacidade de operação dessa via na transmissão de doenças ao homem.

O problema, entretanto, bacteriológicamente, tem sido pouco estudado. Uma das razões de tal situação poderia ser o fato de, nos centros sanitariamente mais adiantados onde, em geral, se desenvolvem e se padronizam as técnicas bacteriológicas, quase não existir esse problema, devido ao controle exercido sobre a horticultura, tanto sobre a espécie de adubo utilizado na fertilização do solo, como sobre a água de irrigação.

Assim, por exemplo, desde 1933, o Departamento de Saúde do Estado da California adotou as regras bastante rígidas relativas ao uso de efluentes de esgotos para fins de irrigação. Efluentes parcialmente tratados ou desinfectados não podem ser empregados na irrigação de hortas ou plantação de qualquer fruto que cresça próximo ao solo. Mesmo em relação a pastos a legislação da California é bastante estrita, porquanto proíbe a pastagem de vacas leiteiras em campos irrigados com esgotos.

A Conferência sobre Águas de Irrigação Poluídas, realizada em 1950, em El Paso, Texas, recomendou que para uso no cultivo de qualquer vegetal destinado a consumo humano, especialmente aquêles destinados a serem consumidos sem cocção, águas provenientes de esgotos deverão ser estéreis.

Legislação semelhante a essa tem sido adotada em outros estados americanos, assim como em outros países, o que reflete o cuidado em proteger a saúde dos consumidores de hortaliças contra os possíveis riscos daí provenientes. Necessário se faz que entre nós também se proceda igualmente: é o que se deve concluir do presente estudo.

Esta série de investigações tinha por finalidade máxima o conhecimento das condições sanitárias das hortaliças distribuídas à

população da cidade de São Paulo. A falta de métodos bacteriológicos estudados para o exame de hortaliças levou-nos, porém, à realização de investigações sobre técnicas, constantes do estudo ora apresentado.

Essas técnicas levadas a efeito visando o exame exclusivamente de alface, hortaliça escolhida por ser a de maior consumo entre nós poderão ser aplicáveis a outras hortaliças, desde que seus sucos não manifestem nenhum efeito bactericida.

Na presente série de pesquisas procuramos determinar a intensidade de contaminação de bactérias coliformes, de Escherichia coli e de enterococos. Para todos esses germes experimentamos comparativamente diferentes técnicas bacteriológicas, quase todas elas já suficientemente experimentadas na análise da água.

Fomos levados a pesquisar essas diversas bactérias, reconhecidas e utilizadas no exame de água, como reveladoras de poluição fecal, por não haver nada estabelecido sobre qual a bactéria ou grupo bacteriano mais eficaz como indicador de tal poluição no caso de hortaliças.

Os exames realizados para coliformes demonstraram a existência de densidades médias muito grandes nos diferentes lotes examinados. O uso da prova completa após isolamento em placas de EAM, revelou-se, porém, demasiadamente trabalhoso. A frequente falta de caracterização das colônias isoladas, que nos obrigou, nos numerosíssimos casos em que não havia nenhuma colônia de aspecto pelo menos aproximado do aspecto típico, a se tomar duas colônias quaisquer, torna o processo dispendioso e de precisão pouco satisfatória. O emprego da prova de confirmação em DLVB, extraordinariamente simples, revelou porém, resultados muito exagerados, quando comparados com os da prova completa. Tal fato traz, naturalmente, a suspeita de inespecificidade desse método de confirmação, o que, porém, não pôde ser comprovado desta vez.

A determinação das densidades de Escherichia coli, realizada através das provas padrões norte-americanas de pesquisa de coliformes na água revelou-se também imprecisa na fase de confirmação em

placas de EAM e pôde demonstrar números de Escherichia coli bem menores que os revelados por método mais eficiente.

Este último, feito pela inoculação das suspensões de alface liquidificada em caldo lactosado - empregado apenas como meio de enriquecimento, e por isso incubado somente até 24 horas - e pela transferência de cultura assim obtida ao caldo LAB, de Levine, incubado a 43° C, também somente até 24 horas, revelou-se processo extraordinariamente simples, rápido e eficaz.

As densidades médias de Escherichia coli determinadas nos vários lotes examinados, foram muito elevadas, indicando alto gráude contaminação fecal, uma vez que esta bactéria é por todos reconhecida como de origem estritamente intestinal. As densidades encontradas foram, no entanto, muito menores que as obtidas para o grupo coliforme. A relação entre as médias dos NMP de Escherichia coli obtidos pela identificação das culturas em LAB e as médias dos NMP de coliformes determinados pela prova completa, foi de 1 para 124, enquanto é sabido que nas fezes tal relação costuma ser da ordem de 90 a 95 para 1.

Uma alteração de tal ordem na relação natural dos germes nas fezes nos faz suspeitar ou da muito menor capacidade de sobrevivência da Escherichia coli no meio em consideração, relativamente à dos outros membros do grupo coliforme, ou da inespecificidade da prova completa de determinação de coliformes. Talvez a definição das bactérias coliformes, em que se baseia o método de identificação constante da realização da prova completa seja demasiadamente ampla, pelo menos no caso da pesquisa de coliformes em vegetais, sujeitos a contacto íntimo com o solo. É sabido que ha espécies dos gêneros Ervinia e Serratia, bactérias que têm por habitat o solo e vegetais, que cumprem todas as condições da identificação dos coliformes, como definida nos métodos padrões norte-americanos utilizados. A densidade desses germes de mais difícil caracterização, nunca foi determinada em alfaces. Não se pode pois afirmar que todos os báilos identificados como coliformes, realmente o sejam.

Tal fato, aliado à dificuldade de realização, duração (até 100 horas) de acôrdo com os métodos padrões norte-americanos) e

mesmo, à imprecisão da prova completa de determinação de coliformes, levou-nos a preferência do uso da Escherichia coli como índice das condições sanitárias de alface, bactéria para a qual se pôde estabelecer método simples, com leitura final em apenas 48 horas, e de considerável especificidade. Naturalmente, tendo sido este o processo mais eficiente de pesquisa de Escherichia coli revelado nestes estudos, não nos é possível avaliar o grau de sua sensibilidade.

A aplicação do meio presuntivo DA, seguida da confirmação em AEV, mostrou-se também processo de determinação de enterococos na alface, tão simples quanto o método do caldo LAB para Escherichia coli. Realizado nos tempos de incubação indicados pelos criadores desses dois meios, têm, porém, o duplo da duração. Pelo método de identificação adotado - baseado na classificação dos estreptococos de Sherman, e que deveria ser verdadeiro pelo menos na grande maioria dos casos - o uso dos meios DA e AEV traz resultados altamente específicos.

Este método revelou-se, assim, aplicável e eficiente no exame de alface, e demonstrou densidades de enterococos nessa hortaliça, bem maiores que as de Escherichia coli.

O número de lotes dos quais se isolou salmonela pode parecer pequeno. Dado o tamanho de nossa amostra e a quantidade dessa hortaliça consumida diariamente em São Paulo, é, porém, bastante grande.

O isolamento de Shigella alkalescens de um dos lotes tem, pelo menos, o mérito de revelar claramente a presença de contaminação de origem humana.

Tais resultados demonstram a necessidade de ulteriores investigações nos locais de produção, a fim de se verificar se daí provem o maior contingente de contaminação, como parece mais provável.

Estudos procurando demonstrar o efeito dos graus de contaminação fecal do solo e da água de irrigação sobre a densidade de bactérias de origem fecal presentes na alface são necessários a fim de se estabelecerem padrões com base sólida.

A técnica da liquidificação das folhas e do exame do material assim obtido pelo método do caldo LAB, lido às 24 horas, como empregado nestes estudos, facilitará tal investigação.

A investigação do valor do tratamento das folhas de alface pela lavagem usual em água corrente, cuidadosamente executada, mostrou-se capaz de remover, em termos de média geométrica, cerca de 94 por cento da densidade de Escherichia coli presente nas folhas externas de alface e de, aproximadamente, 97 por cento nas folhas internas.

A densidade residual, porém, freqüentemente atinge níveis elevados.

Os resultados da medida da ação desinfectante de soluções de hipoclorito de sódio, com 50 p.p.m. de cloro, e de iodo, também na concentração de 50 p.p.m., revelaram reduções da mesma ordem, que, progressivamente se desenvolvem de maneira semelhante num e noutro caso.

Por outro lado, a ação oligodinâmica da prata, no método utilizado, demonstrou redução inteiramente negligível.

Mesmo para tratamentos que se demonstraram mais eficientes, observou-se, entretanto, a ocorrência de valores residuais de contaminação ainda bastante altos, como já ocorrera com o tratamento pela lavagem.

Esses resultados, conquanto indicativos de redução considerável no nível de contaminação da alface, não excluem totalmente a possibilidade de risco de saúde ligada ao consumo dessa hortaliça.

Podemos apresentar, como decorrentes do presente estudo, as seguintes conclusões principais:

A - A pesquisa de Escherichia coli presente em alface, pelo método do caldo de lactose-ácido bórico, como empregado nesta investigação, revelou-se método preciso, rápido e prático de avaliação do grau de contaminação fecal.

B - A contaminação de alfaces em São Paulo por bactérias de origem fecal é muito intensa.

C - O isolamento de germes patogênicos do grupo intestinal comprova tal resultado e evidencia risco de saúde aos consumidores.

D - O tratamento da alface pela lavagem cuidadosa, embora reduza consideravelmente o nível de contaminação, freqüentemente permite elevado teor de germes residuais.

E - O uso de soluções germicidas contendo cloro ou iodo produz redução acentuada, embora lenta, da densidade de Escherichia coli nas folhas de alface; entretanto, também a aplicação desses tratamentos não constitui garantia absoluta de destruição das bactérias de origem fecal aí presentes.

B I B L I O G R A F I A

- 1 - ARBON, S.: The cholera epidemic in Egypt - Mode of spread. Lancet 2 | 696, 1947.
- 2 - ABSHAGEN, H.G. & Schinensel, A.: Zum Nachweis virulenter Tuberkelbakterien in Klärramlagen. Zentralbl. Bakt. Abt. I, Orig. 134: 375, 1935.
- 3 - ANONIMO.: Thyphoid fever in Paris. J.A.M.A. 80: 1 628, 1923.
- 4 - BALLANTYNE, E.N.: On certain factors influencing the survival of bacteria in water and in saline solutions. J.Bact. 19: 303, 1930.
- 5 - BARSKI, G.; Mac Donald, A. & Slizewics, P.: Conditions de persistance du virus poliomyelitique dans le suc gastrique humain. Ann.Inst.Pasteur 86: 579, 1954.
- 6 - BAYLIS, J.R.; Gullans, O. & Spector, B.K.: The efficiency of rapid sand filters in removing the cysts of the amoebic dysentery organism from water. Pub.Health Rep. 51: 1567, 1936.
- 7 - BEARD, P.J.: The survival of typhoid in nature. J.Amer.Wat.Wks. Ass. 30: 124, 1938.
- 8 - BEARD, P.J.: Longevity of Eberthella typhosus in various soils. Am.J. Pub. Health 30: 1077, 1940.
- 9 - BEARD, P.J.; Carlson, J.M. & Chambers, R.D.: The survival of Eberthella typhosa in soil. J. Bact. 33: 74, 1937.
- 10 - BEAVER, P.C. & Deschamps, G.: The viability of E. histolytica cysts in soil. Am.J.Trop.Med. 29: 189, 1949.
- 11 - BEAVER, P.C. & Deschamps, G.: The effect of acetic acid on the viability of Endamoeba histolytica cysts. Am.J. Trop. Med. 29: 193, 1949.
- 12 - BOECK, W.C.: The terminal death point of the human intestinal protozoan cysts. Am. J. Hyg. 1: 365, 1921.
- 13 - BOECK, W.C.: On the longevity of human intestinal protozoan cysts: Am.J. Hyg. 1: 527, 1921.
- 14 - BRADY, F. J.; Jones, M.F. & Newton, W.L.: Effect of chlorination of water on viability of cysts of Endamoeba histolytica. War Med. 3: 409, 1943, cit. in Craig & Faust.
- 15 - BROWN, G.C.: Virus excretion and antibody response in clinical and subclinical cases of poliomyelitis. Ann. New York Acad. So. 61: 989, 1955.
- 16 - BROWN, G.C. & Penner, L.R.: Search for extrahuman sources of poliomyelitis virus. J.A. M. A. 136: 1088, 1948.
- 17 - BROWN, H.W.: Studies on the rate of development and viability of the eggs of Aparis lumbricoides and Trichuris trichiura under field conditions. J.Parasitol. 14: 1, 1927.
- 18 - BROWN, L.; Petroff, S.A. & Heise, F.H.: The occurrence of living tubercle bacilli in river water contaminated by sewage from a health resort. Am. J. Pub. Health 6: 1148, 1916.
- 19 - BRUNS, H. & Sierps, F.: The effect of the activation of sewage sludge on pathogenic organisms. Ztschr. Hyg. 107: 571, 1927.

- 20 - BUTTERFIELD, C.T.; Wattie, E., Megregian, S. & Chambers, C.W.: Influence of pH and temperature on the survival of coliforms and enteric pathogens when exposed to free chlorine. Pub. Health Rep. 58:1837, 1943.
- 21 - BUTTERFIELD, C.T. & Wattie, E.: Influence of pH and temperature on the survival of coliforms and enteric pathogens when exposed to chloramine. Pub. Health Rep. 61: 157, 1946.
- 22 - CALDWELL, F.C. & Caldwell, E.L.: Preliminary report on observations on the development of ova of pig and human Ascaris under natural development. J. Parasitol. 14: 254, 1928.
- 23 - CHANG, S.L. & Fir, G.M.: Vitality and destruction of the cysts of Entamoeba histolytica. J. Am. Wat. Wks. Ass. 33: 1705, 1941.
- 24 - CHANG, K. & Ch'in, H.T.: An evaluation of pickled vegetables in the dissemination of Ascaris lumbricoides. Chinese Med. J. 61: 63, 1943. In Trop. Dis. Bull. 42: 744, 1945.
- 25 - CHRISTIANSEN, M.J. & Jepsen, A.: Meddelskr. Dyrloeg 57: 173, 1945, cit. in Jensen.
- 26 - CLARK, P.F.; Schindler, J. & Roberts, D.J.: Some properties of poliomyelitis virus. J. Bact. 20: 213, 1930.
- 27 - COHEN, B.: Disinfection studies. J. Bact. 7: 103, 1922.
- 28 - COURMONT, P.; Rochaix, A. & Lanpin, F.: Disappearance of pathogenic germs during the purification of activated sludge. J. Soc. Chem. Ind. 40: 600 A, 1921, cit. in Rudolfs, Falk & Ragotskie.
- 29 - CREEEL, R.H.: Vegetables as a possible factor in the dissemination of typhoid fever. Pub. Health Rep. 27: 187, 1912.
- 30 - BRAIG, C.F. & Faust, E.C.: Clinical Parasitology 5th ed. Philadelphia, Lea Febiger, 1951.
- 31 - GRAM, E.: The effect of various treatment processes on the survival of helminth ova and protozoan cysts in sewage. Sewage Wks. J. 15: 119, 1943.
- 32 - CUMINS, S.L.; Davies, D. & Acland, G.M.: Living tubercle bacilli in a septic tank effluent. Tubercle 10: 310, 1929.
- 33 - CURNEN, E.C.; Shaw, E.W. & Melnick, J.L.: Disease resembling non-paralytic poliomyelitis associated with a virus pathogenic for suckling mice. J. A. M. A. 141: 894, 1949.
- 34 - DALLDORF, G.: The Coxsackie Group of viruses. Science 110: 594, 1949.
- 35 - DALLDORF, G. & Sickles, G.M.: An unidentified filterable agent isolated from the feces of children with paralysis. Science 108: 61, 1948.
- 36 - DALLDORF, G.; Sickles, G.M.; Pflager, H. & Gifford, R.: A virus recovered from the feces of "poliomyelitis" patients pathogenic for suckling mice. J. Exper. Med. 89: 567, 1949.
- 37 - DEBELL, C.: Further observations and experiments on the cultivation of Entamoeba histolytica from cysts. Parasitology 19: 289, 1927.

- 38 - DOBELL, C. & Laidlaw, P.P.: On the cultivation of Entamoeba histolytica and some other Entozoic amoebae. Parasitology 18: 203, 1926.
- 39 - DUNLOP, S. G.; Twedt, R.M. & Wang, W.L.: Quantitative estimation of Salmonella in irrigation water. Sewage industr. Wastes 24: 1015, 1952.
- 40 - EDITORIAL: Bathing, Sewage and Cows. Lancet 2: 1070, 1954.
- 41 - FALK, L.L.: Bacterial contamination of tomatoes grown in polluted soil. Am. J. Pub. Health 39: 1338, 1949.
- 42 - FANTHAM, H. B. & Porter, A.: Pathogenicity of Giardia (Lamblia) intestinalis to man and experimental animals. Brit. M. J. 2: 139, 1916.
- 43 - FAUST, E.C.: Some facts regarding the relation between nightsoil disposal in China and the propagation of helminthic diseases. Am. J. Trop. Med., 4: 487, 1924.
- 44 - FAUST, E.C.: Amebiasis. Springfield, Illinois, Charles C. Thomas, 1945.
- 45 - FELSENFELD, O. & Young, V.M.: The viability of Salmonella on artificially contaminated vegetables. Poult. Sci. 24: 353, 1945, cit. in Rudolfs, Falk & Ragotzkie ().
- 46 - FIRTH, R.H. & Horrocks, W.H.: An inquiry into the influence of soil, fabrics and flies in the dissemination of enteric infection. Brit. M. J. Vol. 936, 1902, cit. in Beard, ().
- 47 - FLEXNER, S.; Clark, P.F. & Amoss, H., L.: A contribution to the pathology of epidemic poliomyelitis. 19: 205, 1914.
- 48 - FLU, P.C.: Investigations of the duration of life of cholera vibrios and typhoid bacteria in septic tanks at Batavia. Med. Burg. Genesck. Dienst. 179, 1921, cit. in Rudolfs, Falk & Ragotzkie ().
- 49 - FLU, P.C.: Investigations on the auto-purification of water in large reservoirs exposed to the direct rays of the sun. Med. Burg. Genesck. Dienst. 299, 1921, cit. in Rudolfs, Falk & Ragotzkie ().
- 50 - FLÜGGE, C.: Die Verbreitungsweise und Vorhütung der Cholera auf Grund der vorenen epidemiologischen Erfahrungen und experimentellen Forschungen. Ztschr. Hyg. 14: 122, 1893, cit. in Pollitzer ().
- 51 - FRANCIS, T., Jr.; Brown, G.C., Winslie J.D.: Poliomyelitis in Hidalgo County, Texas, 1948. -- Poliomyelitis and Coxsackie viruses in privy specimens. Am. J. Hyg. 58: 310, 1903.
- 52 - FRANKLAND, P.: The bacteriology of water: its present position. J. Soc. Chem. Ind. 30: 319, 1911, cit. in Rudolfs, Falk & Ragotzkie ().
- 53 - FRASER, R.: A study of epidemic catharrhal jaundice. Canad. J. Pub. Health 22: 396, 1931.
- 54 - FRIBERG, L. & Hammarstrom, E.: The action of free available chlorine on bacteria and bacterial viruses. Acta Pathol. & Microbiol. Scandinav. 38: 127, 1956. Am. Bull. Hyg. 32: 62, 1957.
- 55 - FRICK, L.P.; Orth, G.L.; Wilson, N.O.; Malizia, W.F. & Anslow, R.O.:

- Experiences in providing salad vegetables to american forces in Japan. U.S. Armed Forces Med. J. 8: 406, 1957. In Bull. Hyg. 32: 601, 1957.
- 56 - GALVAGNO, O. & Calderini, A.: Lebensdauer und Virulenz des Typhusbacillus in Gruben, Tonnen und in Boden. Ztschr. Hyg. 61: 185, 1908.
- 57 - GARD, S.: The virus of poliomyelitis: physical and chemical aspects. In Poliomyelitis, World Health Organization, Monograph Series n. 26, Geneva, 1955.
- 58 - GARROD, L.E., Revisor.: Is the disinfection of fruit and vegetables with potassium permanganate possible? Bull. Hyg. 31: 452, 1956.
- 59 - GÄRTNER, H.: Über das Absterben von Krankheitserregern im Mist und Kompost. Ztschr. Hyg. 28: 1898, cit. in Galvagno & Calderini ().
- 60 - GARNSTAD, V.: Tuberculous primary infection in three children, occurring in connection with fall into highly contaminated river-water. Acta Tuberc. Scand. 21: 281, 1947.
- 61 - GAUB, W.H.: Environmental sanitation - a Colorado major health problem. A review of the problem. Rocky Mtn med., J. 43: 99, cit. in Dunlop, Twedt & Wang ().
- 62 - GOES, P.de: Estudos sobre os vírus Coxsackie. Laboratório de Microbiologia, Faculdade Nacional de Farmácia, Universidade do Brasil, Rio de Janeiro, 1954.
- 63 - GOES, P.de & Travassos, J.: Coxsackie infections. Lancet 1: 1245, 1954.
- 64 - GORDON, E.: Purification of sewage from cysts of intestinal protozoa. Med. Parasit. & Parasitic Dis., Moscow 10: 236, 1941. In Trop. Dis. Bull. 40: 311, 1943.
- 65 - GRANCHER, J. & Deschamps, E.: Recherches sur le bacille typhique dans le sol. Arch. Méd. exp. Paris. 1: 33, 1889.
- 66 - GRAY, J.D. A.: The isolation of Bacillus paratyphosus B from sewage. Brit. M.J. 1: 142, 1929.
- 67 - GREEN, C.E. & Board, P.J.: The survival of E. Typhi in sewage treatment process. Am. J. Pub. Health 28: 762, 1938.
- 68 - GREENBERG, A.E. & Kupka, E.: Tuberculosis transmission by waste waters. a review. Sewage Indus. Wastes 29: 524, 1957.
- 69 - GREIG, J.: Indian J. Med. Res. 2: 1, 1914, cit. in Suckling ().
- 70 - GRUBB, I.; Laurell, G. & Lindqvist, K.H.: The spreading of infectious agents by contaminated vegetables. Nord Hyg. tidskr. Stocjholm 9: 243, 1947. In Excerpta Med. 1: 1468, 1948.
- 71 - HAACK, K.: Eine hygienische Frage der landwirtschaftlichen Verwertung von Molkerei-Abwasser, Gesundheitsing. 75: 226, 1954, cit. in Greenberg & Kupka ().
- 72 - HALLGREN, R.: Epidemic hepatitis in the country of Västerbotten in

- northern Sweden. Acta med. Scandinav. Supp. 140, 1942.
- 73 - HAMLIN, E.J.: Sewage disposal as a national problem. Conditions in South Africa; need for a united effort. Surveyor 105, cit. in Rudolfs, Falk & Ragotzkie ().
- 74 - HAVENS, W.P., Jr.; Ward, R.; Drill, V.A.; & Paul, J.R.: Experimental production of hepatitis by feeding ieterogenic materials. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 57: 206, 1944.
- 75 - HEATHMAN, L. S.; Pierce, G.O. & Kablor, P.: Resistance of various strains of *E. typhi* and coliegerogenes to chlorine and chloramine. Pub. Health Rep. 51: 1367, 1936.
- 76 - HEICKEN, K.: Zweckmässige Desinfectionen bei Tuberkulose. Off. Gesundheitsdienst 14: 15, 1952, cit. in Greenberg & Kuyken.
- 77 - HEISER, V.: Some considerations on the frequent reappearance of cholera in the Philippine Islands, with statistics beginning with the outbreak in 1902 to January 1908. Philipp. J. Sci. Soc. B. 3: 89, cit. in Pollitzer ().
- 78 - HEUKELEKIAN, H. & Schulhoff, H.B.: Studies on the survival of *Bacillus typhosus* in surface waters and sewage. N.J. Agric. exp. Sta. Bull. 589, 1935, cit. in Rudolfs, Falk & Ragotzkie ().
- 79 - HEUKELEKIAN, H. & Albanese, M.: Enumeration and survival of human tubercle bacilli in polluted waters. I. Development of culture methods of enumeration. Sewage, industr. Wastes, 28: 955, 1956.
- 80 - HEUKELEKIAN, H. & Albanese, M.: Enumeration and survival of human tubercle bacilli in polluted waters. II. Effect of sewage treatment and natural purification. Sewage industr. Wastes, 28: 1094, 1956.
- 81 - HIRST, L.F.: Hookworm disease and Ceylon Sewage Works. Ceylon J. Sci. D 2: 245, 1932. cit. in Rudolfs, Falk & Ragotzkie ().
- 82 - HOARE, C.A.: Handbook of Medical Protozoology. London. Baillière, Tindalland Cox, 949.
- 83 - HONIG, E.L.; Molnick, J.L.; Isacson, P.; Parr, R.; Myers, I.L. & Walton, M.: An epidemiological study of enteric virus infections. Poliomyelitis, Coxsackie and Orphan (ECHO) viruses isolated from normal children in two socio-economic groups. J. Exper. Med. 103: 247, 1956.
- 84 - HORSTMANN, D.M.; Ward, R. & Molnick J.L.: Persistence of virus excretion in the stools of poliomyelitis patients. J. A. M. A. 126: 1061, 1944.
- 85 - HOUSTON, A.C.: Studies in water supply. London, Mac Millan & Co., 1913, cit. in Suckling ().
- 86 - HOUSTON, A.C.: 1st-11th Research Reports to the Metropolitan Water Board, 1906-1915, cit. in Suckling ().
- 87 - HUEBNER, R.J.; Armstrong, C.; Beeman E.A. & Cole R.M.: Studies of Coxsackie viruses: preliminary report of occurrence of Coxsackie

- virus in a southern Maryland community. J.A.M.A. 114: 609, 1950.
- 88 - HUEBNER, R.J.; Cole, R.M.; Beeman, E.A.; Bell, J.A. & Peers, J.H.; Herpangina, etiological studies of a specific infectious disease. J.A.M.A. 115: 628, 1951.
- 89 - JENSEN, K.A. & Jensen K.E.: Occurrence of tubercle bacilli in sewage and experiments on sterilization of tubercle bacilli-containing sewage with chlorine. Acta Tuberc. Scand. 16: 216, 1942.
- 90 - JENSEN, K.E.: Undersøgelser over Forekomst of Uskadeliggørelse of virulente Tuberkelbakterier i Spildevand, Copenhagen, 1948, cit. in Jensen ().
- 91 - JENSEN, K.R.: Presence and destruction of tubercle bacilli in sewage. Bull. World Health Organ. 10: 171, 1954.
- 92 - JORDAN, E.O.; Russell, J.L. & Zeit, F.R.: The longevity of typhoid bacillus in water. J. Infect. Dis. 1: 641, 1904.
- 93 - KAMAL, A.M.: Cholera-some epidemiological problems, Cairo, 1951, cit. in Pollitzer.
- 94 - KARLINSKI, J.: Untersuchungen über das Verhalten der Typhusbazillen in typhösen Dejektionen. Zentralbl. Bakt. 6: 1839, cit. in Galvagno & Calderini ().
- 95 - KARLINSKI, J.: Untersuchungen über das Verhalten der Typhusbazillen im Boden. Arch. Hyg. 13: 1891, cit. in Galvagno ().
- 96 - KELLY, S.M.: Detection and occurrence of Coxsackie viruses in sewage. Am. J. Pub. Health 43: 1532, 1953.
- 97 - KELLY, S.M.; Clark M.E. & Coleman, M.B.: Demonstration of infectious agents in sewage. Am. J. Pub. Health 45: 1438, 1955.
- 98 - KELLY, S.M.; Winsser, J. & Winkelstein, W.: Poliomyelitis and other enteric viruses in sewage. Am. J. Pub. Health 47: 72, 1957.
- 99 - KESSEL, J.F.; Allison, D.K.; Kaimo, M.; Quiros, M. & Gloeckner, A.: The cysticidal effects of chlorine and ozone on cysts of Endamoeba histolytica, together with a comparative study of several encystment media. Am. J. Trop. Med. 24: 177, 1944.
- 100 - KLIGER, I.J.: Investigations of soil pollution and the relation of the various types of privies to the spread of intestinal infections. International Health Board, Monograph 15, Rockefeller Inst. of Med. Res., 1941, cit. in Beard ().
- 101 - KLING, C.: In search of poliomyelitis virus in drinking water. Internat. Bull. Econ. Med. Res. & Pub. Hyg. 40: 161, 1939, cit. in Francis ().
- 102 - KLING, C.: cit. in Task & Paul, cit. by Levaditi. Bull. Acad. Méd. Paris, 123: 335, 1940.
- 103 - KLING, C.: Acta Soc. Med. Suecannae 55: 23, 1929. cit. in Levaditi & Lepine. Les ultravirus des maladies humaines, 2^e ed. Paris, Librairie Maloine, 1948.

- 104 - KLING, C.; Pettersson, A. & Wernstedt, W.: Communications Inst. Med. E-
tat, Stockholm 3: 5, 1912, cit. in Trask, Paul & Vignac (). I.
Poliomyelitic virus in human stools. J. Exp. Med. 71: 751, 1940.
- 105 - KLING, C.; Levaditi, C. & Lepine, P.: Bull. Acad. Méd. (Paris) 102: 158,
1929. cit. in Levaditi, C. & Lepine, P.: Les ultravirus des mala-
dies humaines, 2^e ed., Paris, Librairie Maloine, 1948.
- 106 - KÖSER, A.: Veterinärhygienische Fäger der Abwasserlandbehandlung. Ge-
sundheitsing. 75: 392, 1954, cit. in Greenberg & Kupka ().
- 107 - KOZYN, M.B.: Bacteriological studies of field grown vegetables from
Moscow. Vrach. St. Petersburg 22: 1907, cit. in Tanner ().
- 108 - KRAMER, S.D.; Gilliam A.G. & Molner, J.G.: Recovery of the virus of
poliomyelitis from the stools of healthy contacts in an institutio-
nal outbreak. Pub. Health Rep. 54: 1914, 1939.
- 109 - KRÖGER, E.: S bareilly-Mochweis in Rosefeld- abwasser-, -Schlamma-
und - G₀mdseproben nach siner S. bareilly - Epidemye. Ztschr. Hyg.
139: 202, 1954.
- 110 - KRÖGER, E. & Trettin, G.: Abwasseruntersuchungen auf Tuberkelbakte-
rien. Zentralbl. Bakt., Abt. I, Orig. 157: 206, 1951.
- 111 - KYRIASIDES, K.: Experiments on the importance of protozoa in the
self-purification of water. Gas-u. Wasserfach 74: 891, 1931, cit.
in Rudolfs, F^{lk} & Ragotzkie.
- 112 - LAHRI, M.N.; Das, P.C. & Molik, K.S.: The viability of Vibrio chole-
ra in natural waters. Indian med. Gaz. 74: 742, 1939, cit. in Ru-
dolfs, F^{lk} & R^gotzkie ().
- 113 - LAIRD, A.T.; Kite, G.L. & Stewart, D.A.: The presence of tubercle ba-
cilli in the feces. J. med. Res. 29: 31, 1913.
- 114 - Larmola, E.: Investigation on the number, form, growth and pathogeni-
city of the acid fast microorganisms in the sewage of a sanatorium.
Acta Tuberc. Scandinav. 18: 209, 1944.
- 115 - LEPINE, P.; Sedallian, P. & Sutter, V.: Sur la présence du virus polio-
myelitique dans les matières fécales et sa longue durée d'elimina-
tion chez un porteur sain. Bull. Acad. Méd. (Paris) 122: 141, 1939.
- 116 - LEVINE, M. - Bacterie fermenting lactose and their significance in
water analysis. Cit. in Prescott, S.C. Winslow, C.E.A. & McCrady, M.
H. ().
- 117 - LEVY, E. & Kayser, H.: Ueber die Lebensdauer von Typhusbacillen, die in
Stuhle entleert wurden. Zentral bl. Bakt. 33: 489, 1903.
- 118 - LOWE, R.P.: Quantitative estimation of Salmonelle in irrigation water.
Sewage industr. Wastes 24: 1015, 1952. In Pub. Health Engin. A₅ str.
32, 18, 1952..
- 119 - MacCALLUM, F.O. & Bradley, W.H.: Transmission of infective hepatitis
to human volunteers. Lancet 2: 227, 1944.

- 120 - MacCALUM, F.O.; Goffin, A.P.; Beveridge, J.; Phipps, A.H.; Macrae, A.D. & Cockburn, W.C.: Investigation of poliomyelitis virus in sewage in England and Wales in 1951 using sewer swab technique. Atti del VI Congresso Internazionale de Microbiologia, Roma, 3: 202, 1953.
- 121 - MacCLURE, G.V. & Langmuir, A.D.: Search for carriers in an outbreak of acute anterior poliomyelitis in a rural community. The incidence of virus a feces. Am. J. Hyg. 35: 205, 1942.
- 122 - MADDOCK, E.C.G.: Further studies on the survival time of the bovine tubercle bacillus in soil, soil and dung, in dung and on grass, with experiments on feeding guineapigs and calves on grass artificially infected with bovine tubercle bacilli. J. Hyg. 34: 372, 1934.
- 123 - MALLMANN, W.L. & Litsky, W.: Survival of selected enteric organisms in various types of soil. Am. J. Pub. Health 41: , 1951.
- 124 - MANN, B.: The control of infected fruit, vegetables and lettuce. Pub. Health, London, 60: 143, 1947. In Bull. Hyg. 22: 467, 1947.
- 125 - MARTIN, S.: Preliminary report on the growth of the typhoid bacillus in soil. Annual Reports of the Medical Officer of the Local Government Board, 1897-1900, London, cit. in Rudolf, Falk & Ragotskie ().
- 126 - Mc CLESKEY, C.S.; Christopher, W.N.: The longevity of certain pathogenic bacteria in strawberries. J. Bact. 41: 98, 1941.
- 127 - MELICK, C.O.: The possibility of typhoid infection through vegetables. J. Infect. Dis. 21: 28, 1917.
- 128 - MELNICK, J.L.: Poliomyelitis virus in urban sewage in epidemic and non-epidemic times. Am. J. Hyg. 45: 240, 1947.
- 129 - MELNICK, J.L.; Shaw, E.W. & Curnon, E.C.: A virus isolated from patients diagnosed as non-paralytic poliomyelitis or aseptic meningitis. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 71: 344, 1949.
- 130 - MELNICK, J.L.: Poliomyelitis and poliomyelitis-like viruses of man and animals. Am. Rev. Microbiol. 5: 309, 1951.
- 131 - MELNICK, J.L. & Agren, K.: Poliomyelitis and Coxsackie Viruses isolated from normal infants in Egypt. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 81: 621, 1952.
- 132 - MELNICK, J.L.; Emmons, J.; Coffey, J.H. & Schoof, H.: Seasonal distribution of Coxsackie viruses in urban sewage and flies. Am. J. Hyg. 59: 164, 1954.
- 133 - MILLER, F.J.W.: Recognition of primary tuberculous infection of skin and mucosa. Lancet 1: 5, 1953.
- 134 - MILLER, F.J.W. & Anderson, J.P.: Two cases of primary tuberculosis after immersion in sewage-contaminated water. Arch. Dis. Childhood 29: 152, 1954.
- 135 - MILLS, R.G.; Bartlett, C.L. & Kessel, J. F.: The penetration of

fruits and vegetables by bacteria and other particulate water, and the resistance of bacteria, protozoan cysts and helminth ova to common disinfection methods. Am. J. Hyg. 5: 559, 1925.

- 136 - MOELLER, A.: Zur sputumbeseitigung. Zeitschr. f. Tuberk. u. Heilstätten wes 2: 147, 1901, cit. in Greenberg, & Kupka ().
- 137 - MOORE, B.: The detection of paratyphoid carriers in towns by means of sewage examination. Month Bull. Min. Health 7: 241, 1948, cit.
- 138 - MÜLLER, F.: Ist eine Obst und Gemüse desinfektion durch Kaliumpermanganat möglich? Desinfektion u. Gesundheitswesen 47: 181, 1955. In Bull. Hyg. 31: 442, 1956.
- 139 - MÜLLER, G.: Die Infektion von Gemüsepflanzen durch die Beregnung mit häuslichen Abwasser. Städtehyg. 8: 30, 1957. In Bull. Hyg. 32: 561, 1957.
- 140 - MUSEHOLD, P.: Über die Widerstandsfähigkeit der mit dem Lungensputum herausbeförderten Tuberkelbakterien in abwassern, in Flusswasser und in kultivierten Boden. Arb. Gesundheitsamt 17: 56, 1900, cit. in Greenberg & Kupka ().
- 141 - NEEFE, J.R. & Stokes, J.: An epidemic of infectious hepatitis apparently due to water borne agent. Epidemiologic observations and transmission experiments in human volunteers. J.A.M.A. 128: 1063, 1945.
- 142 - NEEFE, J.R.; Stokes, L.; Baty, J.B. & Reinhold, J.G.: Disinfection of water containing causative agent of infectious (epidemic) hepatitis. J.A.M.A. 128: 1076, 1945.
- 143 - NEWTON, W.L. & Jones, M.F.: The effect of ozone in water on cysts of Epimocba histolytica. Am. J. Med. 29: 669, 1949.
- 144 - NEWTON, W.L.; Bennett, B.J. & Figgat, W.B.: Observations of the effects of various sewage treatment processes upon eggs of Taenia saginata. Am. J. Hyg. 49: 166, 1949.
- 145 - NOLF, L.O.: Experimental studies on certain factors influencing the development and viability of the ova of the human Trichuris as compared with those of the human Ascaris. Am. J. Hyg. 16: 208, 1932.
- 146 - Ohba, T.: On the growth of the eggs of Ascaris lumbricoides. Japan. Zool. (Tokyo) 1: 121, 1923.
- 147 - OGATA, S.: The destruction of ascaris eggs. Ann. Trop. Med. Liverpool 19: 301, 1925.
- 148 - OTTO, G.F.: A study of the moisture requirements of the eggs of the horse, the dog, human and pig ascarids. Am. J. Hyg. 10: 497, 1929.
- 149 - PAUL, J.R.: in Poliomyelitis, World Health Organization, Geneva, 1955.
- 150 - PAUL, J.R.; Trask, J.D. & Culotta, C.S.: Poliomyelitis virus in sewage. Science 90: 1939.

- 151 - PAUL, J.R.; Trask, J.D., & Gard, S.; II. Poliomyelitis Virus in urban sewage. *J. Exper. Med.* 71: 765, 1940.
- 152 - PAUL, J.R. & Trask, J.D.; The virus of poliomyelitis in stools and sewage. *J.A.M.A.* 116: 493, 1941.
- 153 - PENFOLD, W.J.; Woodcock, H.M. & Drew, A.H.; The excystation of Endamoeba histolytica (tetragena) as an indication of the vitality of the cysts. *Brit. M.J.* 1: 714, 1916, cit. in Boeck ().
- 154 - PESCH, K.L. & Squarborn, E.; Chemical and bacteriological sewage investigation. *Gesundheitsang.* 52: 856, 1929, cit. in Rudolfs, Falk & Ragotzkie ().
- 155 - PESSOA, S.H.; *Parasitologia Médica*, 4a. Ed., Rio de Janeiro, Livraria Editora Guanabara, 1954.
- 156 - POLLITZER, R.; Cholera studies - 10. Epidemiology. *Bull. World Health Organ.* 16: 703, 1957.
- 157 - PRAMER, D., Haukelekian, H. & Ragotzkie, R.A.; Survival of tubercle bacilli in various sewage treatment processes. I. Development of a method for the quantitative recovery of Mycobacteria from sewage. *Pub. Health. Rep.* 65: 851, 1950.
- 158 - PRESCOTT, S.C., Winslow, C.E.A. & Mac Crady, M.H.; *Water Bacteriology, with Special Reference to Sanitary Water Analysis*, 6th ed., New York, John Wiley & Sons, 1947.
- 159 - RABINOWITZ, S.B.; The survival of coliforms, Shigella flexneri and Salmonella tennessee in soil and climate of Israel. *Bull. Res. Coun. Israel* 4: 3954, In *Pub. Health Engin. Abstr.* 36: 22, 1956.
- 160 - REMLIGER, R. & Nouri O.; Les microbes pathogènes du sol peuvent-ils pénétrer à l'intérieur des végétaux. *C.R. Soc. Biol.* 67: 646, 1909.
- 161 - RHOADS, C.P.; Survival of the virus of poliomyelitis for eight years in glycerol. *J. Exper. Med.* 49: 701, 1929.
- 162 - ROBINSON, L.K.; Effect of heat and of pH on strains of Coxsackie virus. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 75: 580, 1950.
- 163 - ROCHAIX, A.; Recherches sur la persistance et la disparition des germes pathogènes dans l'eau d'égout. *Ann. Hyg. Pub. (Paris)* 8: 669, 1930, cit. in Rudolfs, Falk & Ragotzkie ().
- 164 - RUCHHOFF, C.C.; Studies on the longevity of B. Typhosus in sewage sludge. *Wks. J.* 6: 1054, 1934.
- 165 - RUDOLFS, W.; Falk, I.L. & Ragotzkie, R.A.; Literature review on the occurrence and survival of enteric, pathogenic, and relative organisms in soil, water, sewage, and sludges, and on vegetation. I. Bacterial and virus diseases. *Sewage industr. Wastes.* 22: 1261, 1950.

- 166 -- RUDOLFS, W., Falk, L.L. & Ragotzkie, R.A.: Literature review on the occurrence and survival of enteric, pathogenic, and related organisms in soil, water, sewage, and sludges, and on vegetation. II. Animal parasites. Sewage industr. Wastes 22: 1417, 1950.
- 167 -- RUDOLFS, W.; Falk, L.L. & Ragotzkie, R.A.: Contamination of vegetables grown in polluted soil. Sewage industr. Wastes 23: 253, 1951.
- 168 -- RUEDIGER, G.F.: Studies on the self-purification of streams. Am. J. Pub. Health, 1: 411, 1911.
- 169 -- RUHLMAN, W.: Ueber das Verhalten des in Erdboden eingesäeten Typhusbacillus. Zentralbl. Bakt. 30: 321, 1901.
- 170 -- RUSSEL, H.L. & Fuller, C.A.: The longevity of Bacillus typhosus in natural waters and in sewage. J. Infect. Dis., Supl. 2: 40, 1906.
- 171 -- SCHABEL, F.M. Jr.; Smith, H.T.; Fishbein, W.H. & Casey A.E.: Stool Virus recovery in subclinical poliomyelitis during incubation, febrile and convalescent periods. J. Infect. Dis. 86: 214, 1950.
- 172 -- SCHLIEFER, C. & Kalies, W.: Quantitative Untersuchungen über die Spulwurmversuchung der Bevölkerung in Landkreis Darmstadt. Zentralbl. Bakt. 154: 70, 1948.
- 173 -- SCHULTZ, E.W.: Recent advances in study of poliomyelitis. J. Pediat. 1: 358, 1932.
- 174 -- SCHULTZ, E.W. & Robinson, F.: The in vitro resistance of poliomyelitis virus to chemical agents. J. Infect. Dis. 70: 193, 1942.
- 175 -- SHMEIKO, A.I.: On the degree of infestation of vegetables and fruit with the eggs of helminths in Samarkand. Med. Res., Voronezh Moscow. 13: 77, 1944.
- 176 -- SCHMIDT, B.: Die Desinfektion der Abwässer von Lungenheilstätten. Ztschr. Hyg. 133: 401, 1952.
- 177 -- SCOTT, R.D. & McClure, G.M.: The hydrogen-ion concentration of lime treated water and its effect on bacteria of the colon-typhoid group. J. Amer. Wat. Works. Ass. 11: 578, 1924.
- 178 -- SEDWICK, W.T. & Winslow, C.E.A.: Mo., Amer. Acad. Arts Sci. 12: 500, 1902, cit. in Board ().
- 179 -- SENECAI, P.: Primary pulmonary tuberculosis in two children in association with a fall into sewage contaminated water. Acta Tuberc. Scandinav. 24: 357, 1950.
- 180 -- SHAW, F.W.; Melnick, J.L. & Curnon, E.C.: Infection of laboratory workers with Coxsackie viruses. Ann. Int. Med. 33: 32, 1950.
- 181 -- SPECTOR, B.K. & Buky, F.: Viability of Endamoeba histolytica and Endamoeba coli. Pub. Health Rep. 49: 379, 1934.
- 182 -- SPECTOR, B.K., Byllis, J.R. & Gullane, O.: The effectiveness of filtration in removing from water, and of chlorine in killing, the causative organisms of amoebic dysentery. Pub. Health Rep.

49: 709, 1934.

- 103 - STENIUS, R.; Finsk. Vet. Tidnkr. 17: 105, 1911.
- 104 - STEVER, W.; The viability of dysentery bacteria in well water. Hyg. (Berlin) 26: 220, 1911.
- 105 - STEWART, A.D. & Ghosal, S.C.; The germicidal action of the activated sludge process. Ind. J. Med. Res. 16: 909, 1929.
- 106 - STILES, C. W.; Comparative value of sodium hydroxide, copper sulphate, and fermentation in disinfecting human excreta containing eggs of hookworms (Necator americanus) and of ascaris (Ascaris lumbricoides); J. Parasitol. 13: 47, 1927.
- 107 - STOLICES, E.J.; Jones, E.E. & Miles, A.A.; Effect of drying and digestion of sewage sludge on certain pathogenic organisms. Journ. Proc. Inst. Sewage Purif. Part I 36: 1915, cit. in Rudolfs, Falk & Ragotzkie ().
- 108 - STOLL, L.; Die hygienische Bedeutung der Schlachthofabwässer. Ztschr. Hyg. 28: 302, 1956. In Pub. Health Engin. Abstr. 37: 13, 1957.
- 109 - STONE, W.S.; The resistance of Endamoeba histolytica cysts to chlorine in aqueous solutions. Am. J. Trop. Med. 17: 539, 1937.
- 190 - SUCKLING, E.V.; The examination of water and water supplies. London, J. & A. Churchill, Ltd, 1913.
- 191 - SUSUKI, S.; Effect of bleaching powder on typhoid bacilli attached to vegetables. J. Pub. Health Ass. Japan 6: 8, 1930, cit. in Rudolfs, Falk & Ragotzkie ().
- 192 - TAKANO, R.; Ohtsubo, I. & Inoyo, Z.; Studies of cholera in Japan. League of Nations Publication, C.H. 515, Geneva, 1926, cit. in Pollitzer, ().
- 193 - TANNER, F.W.; Public health significance of sewage sludge when used as a fertilizer. Sewage Wtr. J. 7: 611, 1935.
- 194 - THOMPSON, W.J. & Thompson, D.; Some observations on the effect of emetin administration on the free vegetative forms and cysts of Endamoeba histolytica and Endamoeba coli. J. Roy. Army M. Corps 26: 603, 1916, cit. in Book ().
- 195 - TOOMEY, J.A. & Taknos, W.S.; Isolation of poliomyelitis virus from creek water by direct transmission to the "cotton rat". Am. J. Dis. Child. 70: 293, 1945.
- 196 - TRASK, J.D.; Paul, J.R. & Vignoe, A. J.; I. Poliomyelitic virus in human stools. J. Exper. Med. 71: 751, 1940.

- 197 - TRASK, J.D. & Paul, J.R.: Periodic examination of sewage for the virus of poliomyelitis. *J. Exper. Med.* 75: 1, 1912.
- 198 - UFFEIMANN, : Die Dauer der Lebensfähigkeit von Typhus- und Cholerabakterien in Fäkalmassen. *Zentralbl. Bakt.* 1889, 1892, cit. in Galvagno & Calderini, ().
- 199 - Van Rooyen, C.E. & Rhodes, A.J.: *Cirrus Diseases of Man* 2nd Ed. New York, Thomas Nelson & Sons, 1948.
- 200 - VASSILKOVA, Z.: Evaluation of the contamination of vegetables with eggs of helminths in sewage farms with different methods of cultivation. *Med. Res., Voronezh* 10: 217, 1941. *In Trop. Dis. Bull.* 40: 318, 1943.
- 201 - VASSILKOVA, Z.: Viability of helminth eggs in pit latrines. *Med. Res., Voronezh* 9: 231, 1940. *In Trop. Dis. Bull.* 40: 318, 1943.
- 202 - WAGENER, K.; Mitscherlich, E. & Russ, V.: Nachweis von Tuberkulosebakterien in Abwasser von Tuberkuloseheilstätten. *Finsk Vet Tidsskr.* 74: 154, 1953, cit. in Heulelekian & Albanese ().
- 203 - WATTIE, E. & Butterfield, C.T.: Relative resistance of Escherichia coli and Eberthella typhosa to chlorine and chloramines. *Pub. Health Rep.* 59: 1661, 1944.
- 204 - WENYON, C.M. & O'Connor, F.W.: Human intestinal protozoa in the Near East, London, 1917, cit. in Boeck ().
- 205 - WHARTON, L.D.: The development of the eggs of Ascaris lumbricoides. *Philipp. J. Sci., Ser. B*, 10: 19, 1915, cit. in Otto ().
- 206 - WHEELER, J.M.: The viability of Bacillus Typhosus under various conditions. *J. med. Res.* 15: 269, 1906.
- 207 - WIDANT, N.L. & Moens S.: The disappearance of typhoid bacteria in water. *Versl., gewone Vergad. Akad. Amst.* 36: 129, 1927, cit. in Rudolfs, Falk & Rögatzke ().
- 208 - WILLIAMS, R.S. & Hoy, W.A.: The viability of B. tuberculosis (bovis) on pasture land, in stored faeces, and in liquid manure. *J. Hyg.* 30: 413, 1930.
- 209 - WILSON, W.J. & Blair, E.M.McV.: Further experience of the bismuth sulphite media in the isolation of Bacillus typhosus and Bacillus paratyphosus B from faeces, sewage and water. *J. Hyg., Camb.*, 31: 138, 1931.
- 210 - WINFIELD, G.F. & Chin T.: Studies on the control of fecal-borne diseases in North China. VI. The epidemiology of Ascaris lumbricoides in an urban population. *Chinese M. J.* 54: 233, 1938, cit. in

- Rudolfs, Falk & Ragotskie. ().
- 211 - WIPPLE, G.C. & Mayer, A., Jr.: On the relation between oxygen in water and the longevity of the typhoid bacillus. *J. Infect. Dis.*, Supl. 2: 76, 1906.
- 212 - WOLMAN, A.: Hygienic aspects of sewage sludge as fertilizer. *Engng News R. o.* 22: 198, 1924, cit. in Rudolfs, Falk & Ragotskie ().
- 213 - WRIGHT, W.H.; Cram, E.B. & Nolan, M.O.: Preliminary observations on the effect of sewage treatment processes on the ova and cysts of intestinal parasites. *Sewage Wks. J.* 14: 1274, 1912.
- 214 - WURTZ & BOURGES: Sur la présence de microbes pathogènes à la surface des feuilles. *Arch. Méd. expér.* 13: 1900, cit. in Greel ().
- 215 - YORKE, W. & Adams, A.R.D.: Observations on Entamoeba histolytica. II. Longevity of the cysts in vitro, and their resistance to heat and to various drugs and chemicals. *Am. Trop. Med. & Parasitol.* 20: 317, 1926.
- 216 - YOSHIDA, S.: On the resistance of Ascaris eggs. *J. Parasitol.* 6: 22, 1919.
- 217 - ZAVADOVSKY, M.M. & Sidorov, K.M.: The influence of temperature on the development of ascaris. *Trans. Lab. exp. Biol., Zoopark, Moscow* 3: 159, 1928, cit. in Otto ().
- 218 - AYROZA GALVÃO, A.L., Moraes, N.L.A., Birkholz, L.B., Garcez, J.M.F.: Sobre alguns elementos da estrutura epidemiológica da cidade de São Paulo no que se refere a doenças cujos agentes etiológicos se eliminam pelas excretas. *Arq. Fac. Hig. Saúde Pub.* 10: 1, 1956.
- 219 - BECK, M.D., Muñoz, J.A. & Scrimshaw: Studies on diarrheal disease in Central America. I. Preliminary finding on cultural surveys of normal population groups in Guatemala. *Amer. Jour. Trop. Med. & Hyg.* 6: 62, 1957.
- 220 - CHEISTOVÃO, D. de A.: Condições higiênicas e sanitárias dos distritos da Casa Verde, Sant'Ann e Tucuruvi. Relatório apresentado à Cadeira de Higiene da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1939.
- 221 - DUNLOP, S.: Protección contra las enfermedades transmitidas por hortalizas. *Bol. Ofic. Sanit. Panam.* 11: 428, 1956.
- 222 - HORMAECHE, E., Surraco, N.L., Peluffo, C.A. & Aleppo, P.L.: Causes of infantile summer diarrhea. *Amer. J. Dis. Child.* 66: 539, 1943.
- 223 - HORMAECHE, E., Surraco, N.L., Peluffo, C.A. & Aleppo, P.L.: Nuevos estudios sobre las diarreas infantiles de origen infecciosa. *Rev. Hig. Sanit. Pub.* 10: 1, 1956.

Anales Inst. Hig., Montevideo.

- 225 - HOWARD, N.J., and R.E. Thompson, - Isolation of the Colon Group in Water. The Canadian Engineer, 40, 413, 1925.
- 226 - HUDDLESON, I.F., Du Frain, J., Barrons, K.C. & Giefel, M., Anti bacterial substances in paints. Jour. Amer. Med. Veter. Assoc. CV: 394, 1944.
- 227 - LEVINE, M. Bacteria Fermenting Lactose and Their Significance in Water Analysis, Iowa State College of Agriculture and Mechanic Arts Official Publication: 20, N931, Bulletin 62, 1921.
- 228 - NORMAN, N.H. & Kabler, P.W.: Bacteriological study of irrigated vegetables. Sow. & Ind. Wastes 25: 605, 1953.
- 229 - RUDOLFS, W., Falk, L.L., & Ragotzkie, R.A.: Contamination of vegetables grown in polluted soil. I. Bacterial contamination.
- 230 - RUCHHOFF, C.C., J.G. Kallas, B. Chinn, and E.W. Coulter. Colli-aerogenes Differentiation in Water Analysis, Journal of Bacteriology, 21, 407; 22, 125, 1931.
- 231 - STANDARD Methods for the Examination of Dairy Products American Public Health Association, 8th edition - New York, 1941, pag. 126.
- 232 - STANDARD Methods for the Examination for Water, Sewage, and Industrial Wastes, 10th edition. American Public Health Association New York, 1955.
- 233 - STATISTIQUES Epidemiologiques et démographiques annuelles - 1954. Organisation Mondiale de la Santé, Genève, 1957.
- 234 - VAUGHN, R.H., and Levine, M.; Effect of temperature and boric acid on gas production in the socon group. J. Bacteriol.: 29, 24-25.
- 235 - VAUGHN, R.H., Levine, M. and Smith, H.A.: A Buffered boric acid lactose medium for enrichment and presumptive identification of Escherichia coli. Food Research, 16, 10-19, 1951.