



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS  
**INSTITUTO ADOLFO LUTZ**  
SÃO PAULO, SP - BRASIL

**REVISTA**  
do  
**INSTITUTO**  
**ADOLFO LUTZ**

ISSN 0073 - 9855

RIALA6

VOLUME 42

NÚMERO 1/2

JUN./DEZ., 1982



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS  
**INSTITUTO ADOLFO LUTZ**  
SÃO PAULO, SP - BRASIL

## REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

---

### REDATOR RESPONSÁVEL

WALDOMIRO PREGNOLATTO  
*Diretor do Instituto Adolfo Lutz*

### COMISSÃO DE REDAÇÃO

MARCELO OSWALDO ÁLVARES CORRÊA, *Presidente*  
ELZA SCHWARZ GASTALDO BADOLATO  
LUÍS FLORENCIO DE SALLES GOMES  
MYRNA SABINO  
NEUS PASCUET PREGNOLATTO  
ODAIR ZENEBO  
PEDRO PAULO CHIEFFI  
ROBERTO A. PINTO PAES  
SARA TETNER BURSTEIN, *Secretário*

### REDATOR-SECRETÁRIO

DÉBORA DOMINGUES ESTRELLA REBOCHO

---

Endereço/address

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

Publicação semestral/*Bi-annual publication*  
Solicita-se permuta/*Exchange desired*

(\*)

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (Secretaria de Estado  
da Saúde) São Paulo, SP — Brasil, 1941 —

1941-1981, 1-41  
1982, 42 (1/2)

ISSN 0073-9855  
RIALA6

CDD<sub>18</sub> 614.07205



(\*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. *Normas para catalogação de publicações seriadas nas bibliotecas especializadas.* São Paulo, Ed. Polígono, 1972.

Os artigos publicados na REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ são indexados por Analytical Abstracts, Bibliografia Brasileira de Medicina, Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Excerpta Medica, Food Science and Technology Abstracts, Index Medicus Latino-americano, Tropical Diseases Bulletin e Virology Abstracts.

SUMARIO/CONTENTS

- 538 Detecção de antígenos polissacarídicos capsulares e tipagem de *Streptococcus pneumoniae* em líquido cefalorraquidiano pela contraímunoelctroforese  
*Detection of polysaccharidic capsular antigens and typing of Streptococcus pneumoniae isolated from spinal fluid by counterimmunoelctrophoresis*  
Raquel Bellinati Robert PIRES; Augusta Kiyomi TAKEDA; Carmo Elias Andrade MELLEES & Augusto de Escragnolle TAUNAY ..... 1-8
- 539 Crescimento e termo-resistência da *Yersinia enterocolitica*, sorotipo 0<sub>3</sub>  
*Yersinia enterocolitica, serotype 0<sub>3</sub>: growth and thermoresistance*  
Dilma Scala GELLI ..... 9-16
- 540 Frequência de anticorpos para o vírus da influenza tipo C em habitantes da cidade de São Paulo  
*Antibodies to influenza virus type C in inhabitants of São Paulo City*  
Heloisa Helena Barbosa MELLEES & Sueko TAKIMOTO ..... 17-20
- 541 Verificação da migração global nos diferentes tipos de embalagens para alimentos quando submetidos a provas de cessão por período prolongado  
*Determination of global migration in various foods stored in metallic or plastic containers*  
Lúcia Tieco Fukushima MURATA; Neusa Santesso GARRIDO & Neus Pascuet PREGNOLATTO ..... 21-25
- 542 Encefalite herpética: apresentação de um caso devido a *Herpesvirus hominis*, tipo 1  
*Herpetic encephalitis: report of a case due to Herpesvirus hominis, type 1*  
Luís F. de SALLES GOMES; Carlos E. de SALLES GOMES JR.; Ângelo SEMENTILLI; Mary Eiko SAKUMA & Eide D. CAMARGO 27-34
- 543 Níveis de chumbo em alimentos infantis  
*Lead levels in baby foods sold in São Paulo City, Brazil*  
Walkyria H. LARA; Alice Momoyo SAKUMA & Helena YABIKU .... 35-38
- 544 Variação dos níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> em pasta de amendoim e paçoca consumidas no Estado de São Paulo  
*Variation of the content of aflatoxin B<sub>1</sub> in peanut paste and peanut sweet bars consumed in São Paulo state, Brazil*  
Myrna SABINO; Emiko I. INOMATA & Leda C. A. LAMARDO ..... 39-44

545	Resíduos de pesticidas organoclorados em leite humano, São Paulo, Brasil, 1979-1981 <i>Organochlorine pesticide residues in human milk, São Paulo, Brazil, 1979-1981</i> Walkyria H. LARA; Heloisa H. C. BARRETTO & Odete N. K. INOMATA	45-52
546	Níveis de nitratos em hortaliças <i>Nitrate levels in fresh vegetables sold in São Paulo City, Brazil</i> Walkyria H. LARA & Mickiko Y. TAKAHASHI	53-57
547	Resposta ao pentetrazol em camundongos albinos com infecção crônica por <i>Toxoplasma gondii</i> <i>Response to pentetrazol in white mice chronically infected with Toxoplasma gondii</i> Pedro Paulo CHIEFFI & Edson do NASCIMENTO	59-62
548	Anticorpos anti-reticulina em soros de camundongos albinos experimentalmente infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> <i>Anti-reticulín antibodies in sera from white mice experimentally infected with Schistosoma mansoni</i> Mirthes UEDA; Pedro Paulo CHIEFFI; Roberto A. Pinto PAES; Paulo M. NAKAMURA & Roselisa da Silva GORDINHO	63-66
549	Anticorpos circulantes antinervo periférico na esquistossomose mansônica <i>Anti-peripheral nerve antibodies in the blood of patients with Manson's schistosomiasis</i> Pedro Paulo CHIEFFI; Roberto A. Pinto PAES; Mirthes UEDA; Paulo M. NAKAMURA & Lilian B. MELLO	67-70
550	Partículas virais em cultura de células BHK-21: ultraestrutura, ocorrência e significado <i>Ultrastructure, occurrence and interpretation of virus-like particle in BHK-21 cells</i> Marli UEDA; Hatune TANAKA; Dalton R. WEIGL & Paulo P. JOAZEIRO	71-75
	ÍNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX	77
	ÍNDICE DE ASSUNTO	79
	SUBJECT INDEX	81

## AOS COLABORADORES

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

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

### NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Os originais deverão ser redigidos na ortografia oficial, apresentados em duas vias (original e primeira cópia), datilografados com duplo entrelinhamento em folhas de papel tamanho ofício (evitando cortar as palavras no final da linha, mesmo que a margem fique irregular), com margens de 3 cm de cada um dos lados e numeradas com algarismos arábicos no ângulo superior direito. As ilustrações e respectivas legendas, e os rodapés serão apresentados à parte.

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

#### *Página de rosto*

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

#### *Texto*

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

#### *Material de referência*

Resumos (em português e em inglês)  
Descritores  
Referências bibliográficas

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

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

**UNIDADES DE MEDIDA E SEUS SÍMBOLOS** — Deverão ser usadas somente as unidades legais de medir do sistema nacional de metrologia, definidas em decreto (BRASIL. Leis, decretos, etc. Decreto n. 81.621 de 3 de maio de 1978. *Diário Oficial*, Brasília, 4 mai. 1978. Seção 1, pt. 1, p. 6281-86).

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

Na ausência de um dado numérico, emprega-se um dos seguintes sinais convencionais:

—	quando, pela natureza do fenômeno, não puder existir o dado;
Z	quando o dado for rigorosamente zero;
...	quando não se dispuser do dado;
0	} quando a aplicação dos critérios de arredondamento não permitir alcançar, respectivamente, os valores 1; 0,1; 0,01 etc.;
0,0	
0,00	
X	quando o dado for omitido para evitar a individualização da informação.

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

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

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

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

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

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

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

*No texto* — Serão citadas por meio de número índice correspondente ao da lista de referências e escritas em versal; assim, para um autor: ... TAUNAY<sup>21</sup> verificou ...; para dois autores ... LEME & CARRIJO<sup>10</sup>, pesquisando ...; para mais de dois autores: ... No trabalho de TSUNODA *et alii*<sup>6</sup>; ou ainda ... segundo vários autores<sup>1, 3, 7, 8</sup>.

*Na lista de referências* — Terão numeração consecutiva e serão ordenadas alfabeticamente pelo último sobrenome do autor (regra geral), citando-se todos os autores do artigo.

Para artigos de periódicos

Último sobrenome do(s) autor(es) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título do artigo, título do periódico abreviado (*World list of scientific periodicals*, 4<sup>th</sup> ed. London, Butterworths, 963-65. 3 v.), em grifo, n.º do volume, n.º do fascículo (quando a numeração não for continuada), páginas inicial e final do artigo, data da publicação do volume ou fascículo.

Ex.:

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

Para livros

Último sobrenome do(s) autor(es) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título da obra, (em grifo), n.º da edição (se não for a primeira), local de publicação, editor (quando não coincidir com o autor), ano de publicação, n.º de páginas ou volumes (ou n.º da página consultada).

Ex.:

CANTAROW, A. & SHEPARTZ, B. — *Bioquímica*. 3.<sup>a</sup> ed. Guanabara, Atheneu, 1968. p. 325.

## DA PUBLICAÇÃO

1. Os trabalhos destinados à publicação na *Revista do Instituto Adolfo Lutz* deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz.
2. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação, que poderá sugerir ao autor alterações do original. Este original só será aceito quando tiver o visto da Comissão de Redação.
3. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.
4. Os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de recebimento, salvo o caso especial de *nota prévia*, que terá prioridade.
5. A data de recebimento do artigo constará obrigatoriamente no final do mesmo.
6. A primeira prova tipográfica será revisada pelo redator-secretário e conferida pelo autor, que a rubricará.
7. Os originais de trabalhos aceitos para publicação não serão devolvidos aos autores.
8. Os autores terão direito a 70 separatas; quando desejarem maior número, deverão entender-se com o redator-secretário da Revista.
9. É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, na conformidade da legislação sobre Direitos Autorais.

## DA DISTRIBUIÇÃO

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



## DETECÇÃO DE ANTÍGENOS POLISSACARÍDICOS CAPSULARES E TIPAGEM DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO PELA CONTRAIMUNOELETROFORESE \*

Raquel Bellinati Robert PIRES \*\*  
Augusta Kiyomi TAKEDA \*\*  
Carmo Elias Andrade MELLES \*\*  
Augusto de Escragnolle TAUNAY \*\*

RIALA6/538

PIRES, R.B.R.; TAKEDA, A.K.; MELLES, C.E.A. & TAUNAY, A.E. — Detecção de antígenos polissacarídicos capsulares e tipagem de *Streptococcus pneumoniae* em líquido cefalorraquidiano pela contraímuno-elektroforese. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 42(1/2):1-8, 1982.

**RESUMO:** Foi estudada a aplicação da contraímuno-elektroforese em fitas de acetato de celulose no diagnóstico das meningites por *S. pneumoniae* e na sorotipagem dos pneumococos responsáveis por esta infecção em nosso meio. Este método foi aplicado em 547 amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes internados no Hospital Emílio Ribas, São Paulo, Brasil. Antígenos polissacarídicos capsulares deste microorganismo foram detectados em 85,18% das 216 amostras positivas na cultura, quando se utilizou soro polivalente contra os 83 tipos de pneumococo. Este índice se elevou a 90,74% quando foram utilizados, separadamente, 9 diferentes pools de soros, contendo cada um anticorpos específicos para 7 até 11 tipos de pneumococo. Sete das 296 amostras de líquido cefalorraquidiano, negativas na cultura e na bacterioscopia, foram positivas na contraímuno-elektroforese, e 28 das 35 amostras de líquido cefalorraquidiano, negativas na cultura e positivas na bacterioscopia, foram também positivas na contraímuno-elektroforese. Foi verificada acentuada prevalência de pneumococos dos grupos 6 e 18 em crianças de até 9 anos. Nas faixas etárias mais altas, foram frequentes os tipos 1, 2, 3 e 4, e os grupos 7 e 12. O método clássico (Neufeld) de sorotipagem aplicado em algumas cepas isoladas de líquido cefalorraquidiano apresentou concordância absoluta com a contraímuno-elektroforese, quanto aos tipos de pneumococo identificados em cada caso. Na tipagem do pneumococo foi utilizado o sistema de nomenclatura dinamarquês.

**DESCRIPTORIOS:** meningite pneumocócica, imunodiagnóstico; *Streptococcus pneumoniae* no líquido cefalorraquidiano, identificação dos sorotipos; contraímuno-elektroforese.

### INTRODUÇÃO

A contraímuno-elektroforese (CIE) é muito útil no diagnóstico das meningites sépticas pois permite identificar quantidades mínimas de antígenos bacterianos no líquido cefalorraquidiano (LCR), principalmente os de natureza polissacarídica.

As bactérias capsuladas, como *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *S. pneumoniae*, responsáveis por mais de 90% dos casos de infecções bacterianas das meningites, podem ser facilmente identificadas por esta técnica, através dos polissacarídeos capsulares, presentes no LCR<sup>7, 9, 13</sup>.

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

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

A possibilidade de se prevenirem as infecções pneumocócicas por meio de vacinas que contêm polissacarídeos purificados e de alto peso molecular já foi demonstrada<sup>3,4</sup>. De todas essas verificações, ficou bem evidenciado que, para essas vacinas serem eficazes, devem conter polissacarídeos idênticos àqueles presentes na cápsula da bactéria responsável pela infecção, sendo portanto necessário identificar não só o agente etiológico como também o tipo sorológico a que pertence.

Com esse objetivo, vêm sendo elaborados trabalhos visando identificar, em vários países, quais os tipos prevalentes de *S. pneumoniae* nas infecções humanas<sup>6, 8, 10, 12, 14</sup>.

O método clássico para identificação dos pneumococos tem sido o de Neufeld (reação *quellung*), no qual o entumescimento da cápsula da bactéria, quando é tratada por soros específicos, permite identificar qual o tipo sorológico da mesma. Porém, a sorotipagem pela contraímunoeletroforese em gel de agarose já foi utilizada por alguns autores, como alternativa para este método<sup>8, 14</sup>.

No presente trabalho foram verificados os tipos prevalentes de *S. pneumoniae* nas infecções meningéas, através da contraímunoeletroforese em fitas de acetato de celulose.

## MATERIAL E MÉTODOS

Em 1977 e 1978 foram estudadas 547 amostras de LCR de pacientes internados no Hospital Emílio Ribas, das quais, em 251, o pneumococo foi identificado pelos métodos clássicos de cultura, ou sua presença revelada pela bacterioscopia pelo método de Gram; nas outras 296 amostras de LCR a etiologia da infecção não foi identificada pelos métodos bacteriológicos clássicos.

Dentre as cepas de pneumococo isoladas, algumas foram tipadas no Serviço do Dr. Robert Austrian, do Laboratório de Referência de Pneumococos da Universidade de Pennsylvania, Estados Unidos.

O sistema de nomenclatura utilizado na tipagem do pneumococo foi o dinamarquês. *Soros utilizados* (do Statens Serum Institute, Copenhague, Dinamarca)

— *Omniserum*, soro polivalente que contém anticorpos para os 83 tipos de *S. pneumoniae*.

— Nove *pools* (mistura de vários soros) simbolizados alfabeticamente de A até I, cada qual contendo de 7 a 11 soros monoespecíficos. Estes *pools*, juntos, continham o total de anticorpos para os 83 tipos de *S. pneumoniae*.

— Soros específicos para cada um dos tipos ou grupos de *S. pneumoniae*.

Os exames bacteriológicos constaram de bacterioscopia pelo método de Gram, modificado por Hucker, e de cultura em meio de ágar-sangue, base Mueller-Hinton, e caldo Mueller-Hinton hipertônico. Após crescimento bacteriano, se confirmada a presença de diplococos Gram-positivos, eram feitas provas diferenciais com discos de optoquina e era verificada a fermentação da inulina.

## Contraímunoeletroforese

Foi realizada em fitas de acetato de celulose<sup>13</sup>, utilizando-se tampão barbital acetato, pH 8,6, força iônica = 0,05, durante 10 minutos, voltagem fixa 200 V.

## RESULTADOS

Na tabela 1 verificamos que das 216 amostras de LCR, em que a bactéria foi identificada pelos métodos bacteriológicos usuais, em 85,18% foi também possível detectar a presença de antígenos capsulares de *S. pneumoniae*, quando o soro usado na corrida eletroforética foi o *omniserum*. Dos 296 casos, com exame bacteriológico negativo, em 7 a CIE revelou a presença desses antígenos.

A tabela 2 representa o número de amostras reagentes na CIE, com os *pools* de soros A — I, comparado com o número de amostras positivas, quando se utilizou o *omniserum*. Esta comparação foi possível em apenas 191 casos, uma vez que não tínhamos LCR suficiente para que a prova fosse realizada em todos os casos incluídos na tabela 1. A utilização desses *pools* de soros possibilitou a detecção de antígenos capsulares de *S. pneumoniae* em 12 amostras de LCR que não haviam apresentado reação com o *omniserum*. Desta forma, o índice de positividade pela prova de CIE elevou-se de 85,18 para 90,74%.

Como se observa na tabela 3, houve uma variação na distribuição dos tipos prevalentes de *S. pneumoniae*, quando se compararam dois períodos de 11 meses separadamente.

Os resultados obtidos na sorotipagem de 52 amostras de LCR pelo método de Neufeld no Laboratório de Referência de Pneumococos da U.P., E.U.A., foram comparados com os resultados obtidos com a CIE. Ambos os métodos foram concordantes quanto ao tipo de pneumococo identificado em cada caso, porém, em 4 amostras reativas na CIE os germes isolados não apresentaram reação *quellung*, e foram identificados como *Streptococcus* sp.  $\alpha$ -hemolíticos. Destas amostras, uma foi reativa na CIE com soro específico para pneumococo do grupo 6 e três, reativas com soro específico para pneumococo do tipo 8.

Afastados todos os casos nos quais não foi possível identificar a idade, verifica-se, conforme a tabela 4, acentuada prevalência dos tipos pertencentes aos grupos 6 e 18, em crianças com idade até 4 e 9 anos, respectivamente. Na faixa etária até um ano, além

dos tipos acima mencionados, também foram freqüentes os pneumococos do tipo 5 e do grupo 9. Já nas faixas etárias mais altas, 20 anos ou mais, foram mais freqüentes os pneumococos dos tipos 1, 2, 3 e 4, e dos grupos 7 e 12.

TABELA 1

*Comparação entre os resultados dos exames bacteriológicos e contraímunoeletroforese, quando o soro utilizado na corrida eletroforética foi o omniserum*

Exame bacteriológico	Contraímunoeletroforese		Total de amostras analisadas
	Amostras positivas	Amostras negativas	
Bacterioscopia (DGP*) Cultura (P*)			
Bacterioscopia positiva Cultura positiva	184	32	216
Bacterioscopia positiva Cultura negativa	28	7	35
Bacterioscopia negativa Cultura negativa	7	289	296
Total	219	328	547

\* (DGP) = diplococos Gram-positivos.

\* (P) = pneumococos.

TABELA 2

*Comparação entre os resultados obtidos pela contraímunoeletroforese das amostras de líquido cefalorraquidiano com omniserum e pools A — I*

Omniserum	Pools A — I		
	Amostras positivas	Amostras negativas	Total
Amostras positivas	163	0	163
Amostras negativas	12	16	28 (*)
Total	175	16	191

(\*) Presença de *S. pneumoniae* verificada por cultura do líquido cefalorraquidiano.

PIRES, R.B.R.; TAKEDA, A.K.; MELLES, C.E.A. & TAUNAY, A.E. — Detecção de antígenos polissacarídicos capsulares e tipagem de *Streptococcus pneumoniae* em líquido cefalorraquidiano pela contraímunoeletroforese. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):1-8, 1982.

TABELA 3

*Distribuição dos tipos e grupos de S. pneumoniae detectados pela contraímunoeletroforese em líquido cefalorraquidiano, durante um período de 22 meses (1977-1978)*

Tipos e grupos (Sistema dinamarquês)	N.º Amostras		Total
	Janeiro-novembro 1977	Dezembro-outubro 1977 — 1978	
1	8	7	15
2	6	1	7
3	5	2	7
4	1	6	7
5	6	4	10
6	17	7	24
7	2	2	4
8	3	4	7
9	4	1	5
10	0	2	2
11	1	1	2
12	5	3	8
13	0	1	1
14	3	1	4
15	2	3	5
16	0	1	1
17	0	1	1
18	9	7	16
19	2	3	5
20	0	2	2
21	0	2	2
22	1	0	1
23	1	8	9
25	1	0	1
29	1	1	2
33	0	1	1
45	0	1	1
48	1	0	1
NT-1(*)	5	1	6
NT-2	5	1	6
NT-3	5	3	8
NT-4	1	2	3
NT-5	0	1	1

(\*) NT = Pneumococos não sorotipados; identificados apenas pelos pools de soros: 1) pool B; 2) pool D; 3) pool E; 4) pool H; 5) pool I.

TABELA 4

Distribuição dos tipos e grupos de *S. pneumoniae* de acordo com a faixa etária dos pacientes com meningite

Faixa etária	Tipos e grupos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> (Sistema dinamarquês)																												Total	
	1	2	3	4	5	6*	7*	8	9*	10*	11*	12*	14	15*	16	17*	18*	19*	20	21	22*	23*	25	28*	29	33*	45	48		
0  — 12 meses	2	2	1	1	4	8	-	2	3	-	-	2	1	1	-	-	3	1	-	1	-	2	-	-	2	1	-	-	-	37
1  — 4 anos	-	-	-	-	-	7	-	1	-	1	-	1	2	2	-	1	5	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	23
5  — 9 anos	1	-	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	3	1	1	-	-	1	-	2	-	-	-	-	-	13
10  — 14 anos	3	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
15  — 19 anos	2	-	-	2	1	1	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
20  — 49 anos	4	3	5	3	2	-	3	1	-	-	-	3	-	1	1	-	2	-	-	1	1	1	1	1	-	-	-	1	1	34
50 ou mais anos	-	2	1	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
Total	12	7	7	7	8	18	3	7	4	2	2	7	4	5	1	1	14	5	2	2	1	7	1	2	2	1	1	1	134	

(\*) Grupos aos quais pertencem 2 ou mais tipos de pneumococos.

Observação: Os casos de idade ignorada foram excluídos desta tabela.

PIRES, R.B.R.; TAKEDA, A.K.; MELLERS, C.E.A. & TAUNAY, A.E. — Detecção de antígenos polissacarídicos capsulares e tipagem de *Streptococcus pneumoniae* em líquido cefalorraquidiano pela contraímunoeletroforese. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):1-8, 1982.

## DISCUSSÃO

Estes resultados mostram a possibilidade de se identificar o sorotipo de um pneumococo diretamente no LCR através da CIE. A maior ou menor sensibilidade da reação fica na dependência da disponibilidade de soros bastante potentes capazes de identificar quantidades ínfimas de antígeno no LCR. Este fato ficou demonstrado na tabela 2, onde se verificou maior sensibilidade, da CIE, com *pools* de soros A — I, do que com o *omniserum*.

Uma vez identificada a prevalência dos sorotipos de pneumococo numa determinada região, teremos possibilidade de preparar *pools* de soros de maior potência, que poderão ser usados com vantagem em substituição aos que são preparados para regiões onde a distribuição dos tipos de pneumococo difere da nossa.

Os polissacarídeos capsulares dos pneumococos tipos 7F e 14 são neutros e, como não apresentam migração anódica adequada nas condições próprias da CIE, não são detectáveis a menos que se usem sistemas tampões especiais<sup>1</sup>. No entanto, no presente trabalho foram detectados 4 casos de meningite por pneumococos do grupo 7, utilizando-se o tampão convencional (barbital acetato, pH 8,6). Destes casos, 2 foram submetidos ao teste de Neufeld, que confirmou o grupo de pneumococo e revelou positividade de ambos, com soro específico para o tipo 7F. Já o tipo 14 foi detectado pela CIE somente depois de se ter deixado a fita de acetato de celulose em repouso, 18 horas após a corrida eletroforética.

Foi verificado que, em 4 amostras de LCR, reativas na CIE, o germe isolado foi identificado como *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolítico no Laboratório de Referência da U.P. — E.U.A. A ocorrência deste fato se explica pela existência de reações cruzadas entre polissacarídeos capsulares de pneumococos e certas cepas de estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos e não hemolíticos, fato este já descrito por vários investigadores. Como exemplo, podemos citar as reações cruzadas entre antígenos capsulares de estreptococos do grupo F de Lancefield e uma variedade de tipos de pneumococo<sup>11</sup>, entre eles o tipo 7.

São conhecidas também as reações cruzadas entre estreptococos não capsulados e alguns tipos patogênicos de pneumococos<sup>2</sup>, tais como os tipos 1, 2, 3, 6, 8 e 14. A presença de anticorpos que dão reações cruzadas entre estreptococos e pneumococos, em determinados so-

ros, origina uma classificação errônea de ambos. Esta fonte de erros pode ser evitada em grande parte pelo uso da reação *quellung* a qual, quando positiva, demonstra a localização capsular do carboidrato reativo.

Pneumococos capsulados mutantes, que produzem uma cápsula de polissacarídeo solúvel relacionado imunologicamente ao polissacarídeo C da parede celular, têm sido isolados de variantes não capsuladas desses organismos<sup>5</sup>. Anticorpos de alto título para antígenos de parede celular de pneumococo, produzidos a partir desses mutantes, foram testados por AUSTRIAN<sup>2</sup> com várias cepas de estreptococos que dão reações cruzadas com pneumococos. Os resultados obtidos nesses experimentos sugerem a possibilidade de haver reações cruzadas entre os polissacarídeos de parede celular de estreptococos e o polissacarídeo somático de pneumococos.

Segundo AUSTRIAN<sup>2</sup>, estudos anteriormente feitos com estreptococos capsulados que apresentavam reações cruzadas com uma variedade de tipos de pneumococo, mostraram que os primeiros diferem dos últimos por uma série de características. Nenhuma das cepas destes estreptococos foram lisadas pelo desoxicolato, e cerca de 1% se mostrou sensível à optoquina. Das cepas que fermentaram a inulina, a maior parte foi encontrada entre os estreptococos que se apresentaram morfologicamente em cadeias de comprimento moderado e que davam reação cruzada com pneumococo tipo 59.

A despeito da identificação de estreptococos  $\alpha$  — hemolíticos nas amostras de LCR citadas acima, cumpre ressaltar o fato de que em nosso laboratório tais amostras apresentaram diplococos Gram-positivos que em cultura, mostraram características de *S. pneumoniae* (sensibilidade à optoquina e fermentação da inulina).

Sob certos aspectos, a utilização da CIE na sorotipagem de *S. pneumoniae* oferece alguns benefícios, como: permite examinar grande número de amostras em pouco tempo; pesquisa antígenos solúveis os quais podem ser detectados em amostras guardadas há vários meses em refrigeração comum, e não exige experiência por parte do laboratorista, pois a leitura dos resultados é de fácil interpretação.

## Agradecimentos

A Dra. Ilka Lee, do Serviço de Bacteriologia do IAL, pela realização dos exames bacteriológicos.

PIRES, R.B.R.; TAKEDA, A.K.; MELLES, C.E.A. & TAUNAY, A.E. — Detection of polysaccharidic capsular antigens and typing of *Streptococcus pneumoniae* isolated from spinal fluid by counterimmuno-electrophoresis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):1-8, 1982.

ABSTRACT: Counterimmuno-electrophoresis in cellulose-acetate strips were employed for the serological diagnosis of meningitis cases caused by *Streptococcus pneumoniae* as well as in the serotyping of pneumococcus strains isolated from meningitis cases admitted to Emilio Ribas Hospital, São Paulo, S.P., Brazil. Polysaccharidic antigens of pneumococci were detected in 85.18% of the 216 spinal-fluid specimens from which pneumococci were isolated when polyvalent serum against the 83 types was employed. This frequency increased to 90.74% when 9 different pools of sera containing antibodies specific for 7 to 11 types were employed. Of 296 spinal-fluid specimens which were negative in culture and bacterioscopic tests, 7 specimens were positive in the counterimmuno-electrophoresis. Of the 35 specimens which were negative in culture attempts but positive in the bacterioscopic examination, 28 were positive in the counterimmuno-electrophoresis. A clear prevalence of group 6 or 18 pneumococci was found in spinal fluids from children up to 9 year-old. In older individuals, types 1, 2, 3 or 4 and groups 7 or 12 were observed. The classic Neufeld test yielded exactly the same results as the counterimmuno-electrophoresis. The Danish nomenclature was employed.

DESCRIPTORS: meningitis, pneumococcal, immunodiagnosis; *Streptococcus pneumoniae*, in the spinal fluid, serotype identification; counter-current immuno-electrophoresis.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANHALT, J.P. & PAULINE, K.W.Y. — Counterimmuno-electrophoresis of pneumococcal antigens: improved sensitivity for the detection of types VII and XIV. *J. clin. Microbiol.*, 2:510-5, 1975.
2. AUSTRIAN, R. — Streptococci and streptococcal diseases. Recognition, understanding and management. New York, Academic Press, 1972. p. 355-70.
3. AUSTRIAN, R. — Pneumococcal vaccines. *J. Amer. med. Ass.*, 231:345-6, 1975.
4. AUSTRIAN, R. — Prevention of pneumococcal infection by immunization with capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: current status of polyvalent vaccines. *J. infect. Dis.* (Suppl.), 136: S-38-S42, 1977.
5. BORNSTEIN, D.L.; SCHIFFMAN, G.; BERNHEIMER, H.P. & AUSTRIAN, R. — Capsulation of pneumococcus with soluble C-like ( $C_2$ ) polysaccharide. I. Biological and genetic properties of  $C_2$  pneumococcal strains. *J. exp. Med.*, 128: 1385-400, 1968.
6. BROOME, C.V.; FACKLAM, R.R.; ALLEN, J.R. & FRASER, D.W. — Epidemiology of pneumococcal serotypes in the United States, 1978-1979. *J. infect. Dis.*, 141: 119-23, 1980.
7. COONROD, J.D. & RYTEL, M.W. — Determination of aetiology of bacterial meningitis by counterimmuno-electrophoresis. *Lancet*, 1(7759):1154-7, 1972.
8. COONROD, J.D. & RYTEL, M.W. — Detection of type-specific pneumococcal antigens by counterimmuno-electrophoresis. Etiology of pneumococcal pneumonia. *J. Lab. clin. Med.*, 81:778-86, 1973.
9. EARL, A.E.; MUEHL, P.M. & PECKIN-PAUGH, R.O. — Diagnosis of bacterial meningitis by counterimmuno-electrophoresis. *J. Lab. clin. Med.*, 80:449-54, 1972.
10. FINLAND, M. & BARNES, M.W. — Changes in occurrence of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* at Boston City Hospital during selected years between 1935 and 1974. *J. clin. Microbiol.*, 5:154-66, 1977.
11. HEIDELBERGER, M.; WILLERS, J.M.N. & MICHEL, M.F. — Immunochemical relationships of certain streptococcal group and type polysaccharides to pneumococcal capsular antigens. *J. Immunol.*, 102: 1119-35, 1969.
12. LUND, E.; PULVERER, G. & JELSJASZEWIEZ, J. — Serological types of *Diplococcus pneumoniae* strains isolated in Germany. *Med. Microbiol. Immunol.*, 159: 171-8, 1974.

PIRES, R.B.R.; TAKEDA, A.K.; MELLES, C.E.A. & TAUNAY, A.E. — Detecção de antígenos polissacarídicos capsulares e tipagem de *Streptococcus pneumoniae* em líquido cefalorraquidiano pela contraímunoeletroforese. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):1-8, 1982.

---

13. PALHARES, M.; GELLI, D.S.; ALMEIDA, M.C.R.; MELLIS, C.E.A.; TAKEDA, A.K. & TAUNAY, A.E. — Pesquisa de polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* do grupo C no líquido cefalorraquidiano por imunoeletroforese cruzada em acetato de celulose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33:85-89, 1978.
14. TUGWELL, P. & GREENWOOD, B.M. — Pneumococcal antigen in lobar pneumonia. *J. clin. Pathol.*, 28:118-23, 1975.

*Recebido para publicação em 12 de maio de 1981.*



## CRESCIMENTO E TERMO-RESISTÊNCIA DA *YERSINIA* *ENTEROCOLITICA*, SOROTIPO 0<sub>3</sub> \*

Dilma Scala GELLI \*\*

RIAL6/539

GELLI, D.S. — Crescimento e termo-resistência da *Yersinia enterocolitica*, sorotipo 0<sub>3</sub>. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):9-16, 1982.

**RESUMO:** Foram usados alguns substratos, nos pH 5,0, 7,0 e 9,0, para se verificar a influência sobre o crescimento e termo-resistência da *Yersinia enterocolitica*, sorotipo 0<sub>3</sub>, quando relacionados a diferentes temperaturas, tempos de incubação e exposição. Para a avaliação do crescimento, após a inoculação de determinado número de células viáveis, e incubação por 1, 3, 5, 7 e 30 dias, observou-se que, a menos 15°C, a cepa não se multiplica; a 42°C, após 24 horas, encontra-se destruída; a 25°C, o período de adaptação nos diferentes substratos é menor, quando comparado com o das temperaturas de 8 e 37°C; o pH 5,0 favorece o desenvolvimento desta bactéria, e a pectina de batata é particularmente desfavorável à mesma. Para os testes de termo-resistência, as temperaturas selecionadas foram de 68 e 72°C, por períodos de exposição de 1, 2, 4, 6 e 10 minutos, usando-se os mesmos substratos testados no crescimento. Após estes testes, os tubos expostos à ação térmica foram incubados a 8°C, por 25 dias e, em alguns substratos e pH, a cepa foi capaz de se recuperar da injúria que sofrera com o calor.

**DESCRITORES:** *Yersinia enterocolitica*, sorotipo 0<sub>3</sub>; *Yersinia enterocolitica*, crescimento e termo-resistência em diversos substratos; pH; temperatura.

### INTRODUÇÃO

Desde o seu primeiro isolamento, a *Yersinia enterocolitica* recebeu diversas denominações, tais como a de *Pasteurella pseudotuberculosis* tipo b, e a de *Pasteurella X*. Esta bactéria apresenta características peculiares; sua capacidade de se desenvolver a 4°C é útil no seu primeiro isolamento a partir de materiais pluricontaminados; seu fenótipo varia de acordo com o ambiente; quanto à temperatura, por exemplo, é flagelada a 22°C e não apresenta flagelos a 37°C, e a caracterização de sua ação patogênica em animais de laboratório depende do meio de cultura usado para a obtenção do inóculo, da temperatura de incubação do mesmo e, evidentemente, da via de inoculação<sup>2, 8, 9</sup>.

A identificação desta bactéria é feita através de: a) biotipos, segundo os esquemas de NILÉHN e de WAUTERS; b) sorotipos, tendo sido descritos 34 antígenos somáticos e 19 flagelares, estes últimos de pouco interesse, uma vez que estão associados a antígenos somáticos específicos; c) fagotipos<sup>2, 8, 9, 10, 11</sup>.

A *Y. enterocolitica* é responsável por infecções humanas, como enterocolite e adenite mesentérica, e está relacionada entre os agentes de toxi-infecções de origem alimentar, tendo já causado surtos epidêmicos. É isolada do solo, da água, de animais silvestres e domésticos, de hortaliças e legumes, de sorvetes, ostras, leite, etc.<sup>1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11</sup>.

Alguns aspectos da *Y. enterocolitica* pouco conhecidos estão relacionados com a conservação e processo tecnológico de obtenção de ali-

\* Realizado no Departamento de Microbiologia da "Ecole National Supérieure de la Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation (ENSBANA), Université de Dijon", Dijon, França, sob a orientação do Prof. Dr. Victor Caumartin.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

mentos. Através de experimentos de laboratório observou-se que, quando inoculada na carne, esta bactéria é capaz de resistir à temperatura de 51°C, mas não à de 62°C, quando do cozimento normal para obtenção de rosbife; porém, se a inoculação for realizada após o cozimento, a bactéria se multiplica neste substrato, tanto a 25 como a 37°C. HANNA *et alii* testaram a termo-resistência de cinco diferentes cepas de *Y. enterocolitica*, em contato com o leite, verificando que nenhuma delas resistia por mais de 3 minutos, a 60°C, e que duas dentre elas sobreviveram quando expostas a 51°C, pelo mesmo período de tempo. Usando como substrato o meio de infusão de cérebro e coração (BHI), em diferentes pH, estes autores observaram que a cepa testada se desenvolveu em ordem decrescente, nos pH 8,0, 7,0, 6,0 e 9,0, tendo permanecido viável, sem se multiplicar, no pH 5,0, após 24 horas de incubação, a 25°C<sup>2, 4, 5</sup>.

Este trabalho foi realizado com a cepa *Y. enterocolitica* 134:0<sub>3</sub>, sorotipo e fagotipo prevalente de infecções humanas na França, para verificar seu comportamento, frente a diferentes substratos, temperaturas e pH.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cepa

*Yersinia enterocolitica* 134:0<sub>3</sub>, fornecida pelo Dr. H. H. Mollaret do Instituto Pasteur de Paris.

### Manutenção da cepa e preparo do inóculo

A cepa foi mantida em ágar tripton de soja em tubos. Os inóculos foram preparados em água peptonada a 0,1%, pH 7,2 e incubados a 25°C por 24 horas.

### Determinação do número de células viáveis

As diluições necessárias foram preparadas em água peptonada a 0,1%, pH 7,2. As sementeiras foram realizadas na superfície do meio ágar tripton de soja, distribuído em placas (0,1 ml de cada diluição). Foram incubadas a 25°C por 72 horas, após as quais foi efetuada a contagem de colônias.

### Testes de avaliação do crescimento e da termo-resistência

#### a) Meios

Foram preparados sobre o meio base de água peptonada a 0,1%, por adição de glicose, maltose, celulose microcristalina, amido solúvel e leite desnatado, na concentração final de 2%, e por adição de pectina de batata e glicogênio, na concentração de 0,1%, nos pH 5,0, 7,0 e 9,0. Estes meios foram distribuídos à razão de 9 ml por tubo.

#### b) Crescimento

Após a inoculação da cepa, os tubos foram incubados a menos 15°C e 8, 25, 37 e 42°C, por 24 horas e por 3, 5, 7 e 30 dias. Depois de cada período de incubação, retirou-se um tubo de cada substrato em cada pH, para se proceder à contagem de células viáveis, con-

forme já descrito. Os tubos foram manipulados uma única vez.

#### c) Termo-resistência

Após a inoculação da cepa, os tubos foram levados a banhos-maria; um dos banhos foi regulado a 68°C e o outro, a 72°C. Depois de 1, 2, 4, 6 e 10 minutos de exposição, foi retirado um tubo de cada pH e substrato para se proceder à contagem de células viáveis, conforme descrito. Os cuidados necessários à condução do teste foram observados, tais como a flambagem da parte superior do tubo que não continha meio de cultura, e a imersão completa no banho-maria da parte que o continha.

#### d) Recuperação da cepa após o tratamento térmico

Os tubos, depois de expostos ao calor, foram incubados a 8°C, por 25 dias, após o que se procedeu à verificação da presença qualitativa de células viáveis da *Y. enterocolitica* semeada.

## RESULTADOS

Os resultados da avaliação do crescimento da *Y. enterocolitica* estão expressos nos gráficos (fig. 1 e 2), assim como a quantidade inicial de células presente nos meios.

Os resultados obtidos a 15°C negativos, não expressos nos gráficos, revelaram que a cepa não apresentou aumento ou diminuição significativos do número inicial de células; porém, manteve-se viável até o final das observações. Os resultados a 42°C, também não expressos nos gráficos, revelaram ausência de células viáveis após 24 horas de incubação, em todos os substratos, nos pH testados. Entretanto, não se determinou o tempo mínimo necessário depois do qual não era mais possível recuperar a cepa.

Pela observação dos gráficos de crescimento (fig. 1 e 2) conclui-se que o aumento do número de células é marcante só após 7 dias de incubação a 8 e 37°C, enquanto que, a 25°C, a fase de adaptação e multiplicação é mais rápida. Alguns substratos e pH parecem favorecer o desenvolvimento da *Y. enterocolitica*, como o leite desnatado, o glicogênio e o amido, em pH 7,0, nas temperaturas de 8 e 37°C, e a glicose e a maltose, em pH 5,0, na temperatura de 25°C. Entretanto, se não considerarmos a variável período de incubação, a cepa se multiplica em todos os meios e temperaturas testados, com exceção dos meios com pectina de batata e dos incubados a 42 e -15°C.

Os resultados da avaliação da termo-resistência, conforme os gráficos (fig. 3 e 4), demonstram que o pH 5,0 parece proteger a cepa contra a ação do calor. Dependendo do substrato, a termo-resistência varia; assim, os substratos de proteína, de açúcar ou de celulose favorecem a cepa, enquanto que a pectina de batata a desfavorece.

A cepa testada recuperou-se da injúria física causada pelo tratamento térmico, como segue: glicose em pH 5,0, até 6 minutos a 68°C, e até 2 minutos a 72°C; glicose, maltose, leite desnatado e glicogênio em pH 7,0, até 10 minutos a 68°C.

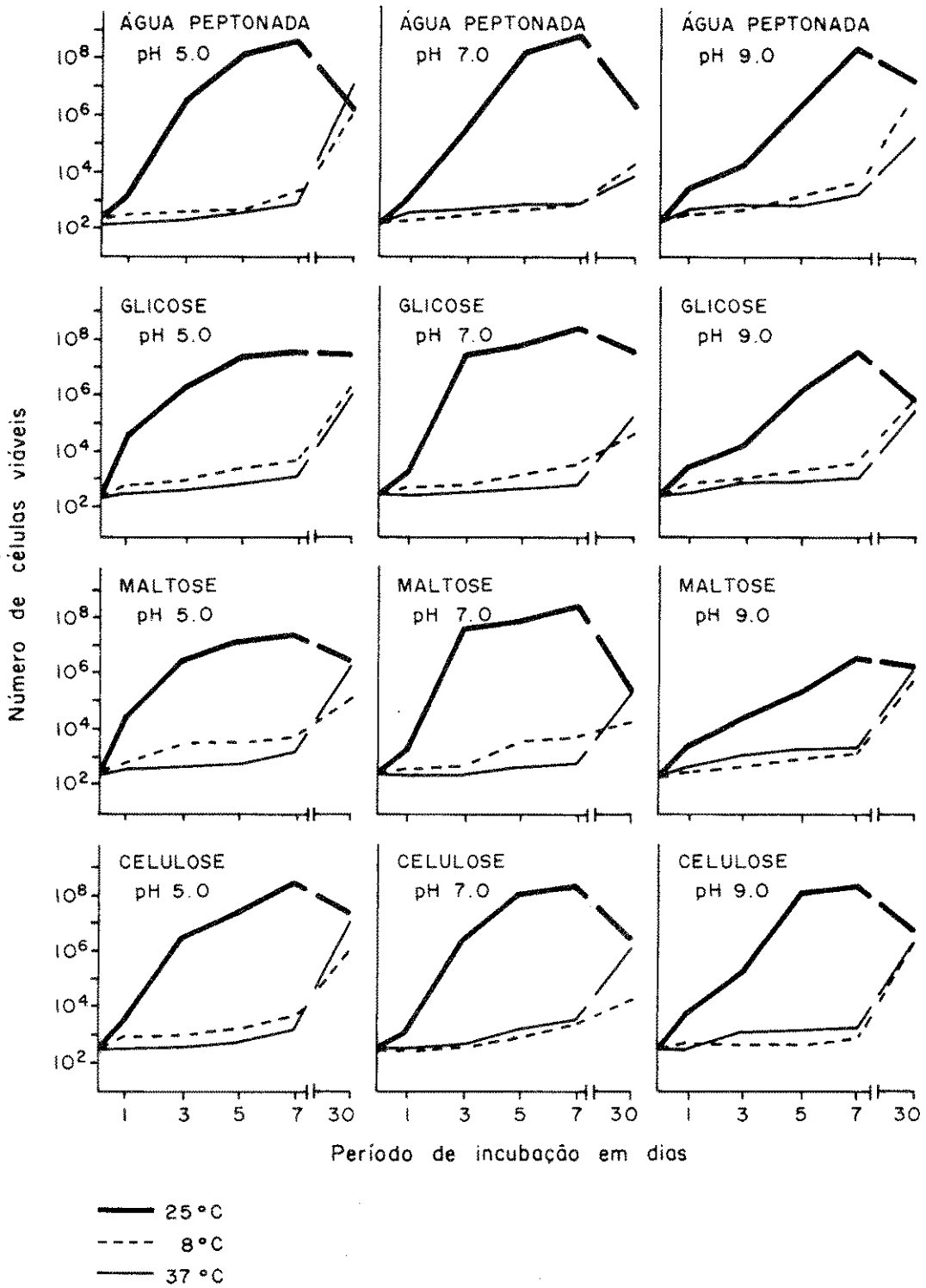


FIGURA 1 — Gráficos de avaliação de crescimento da *Yersinia enterocolitica* frente a diversos substratos em diferentes pH.

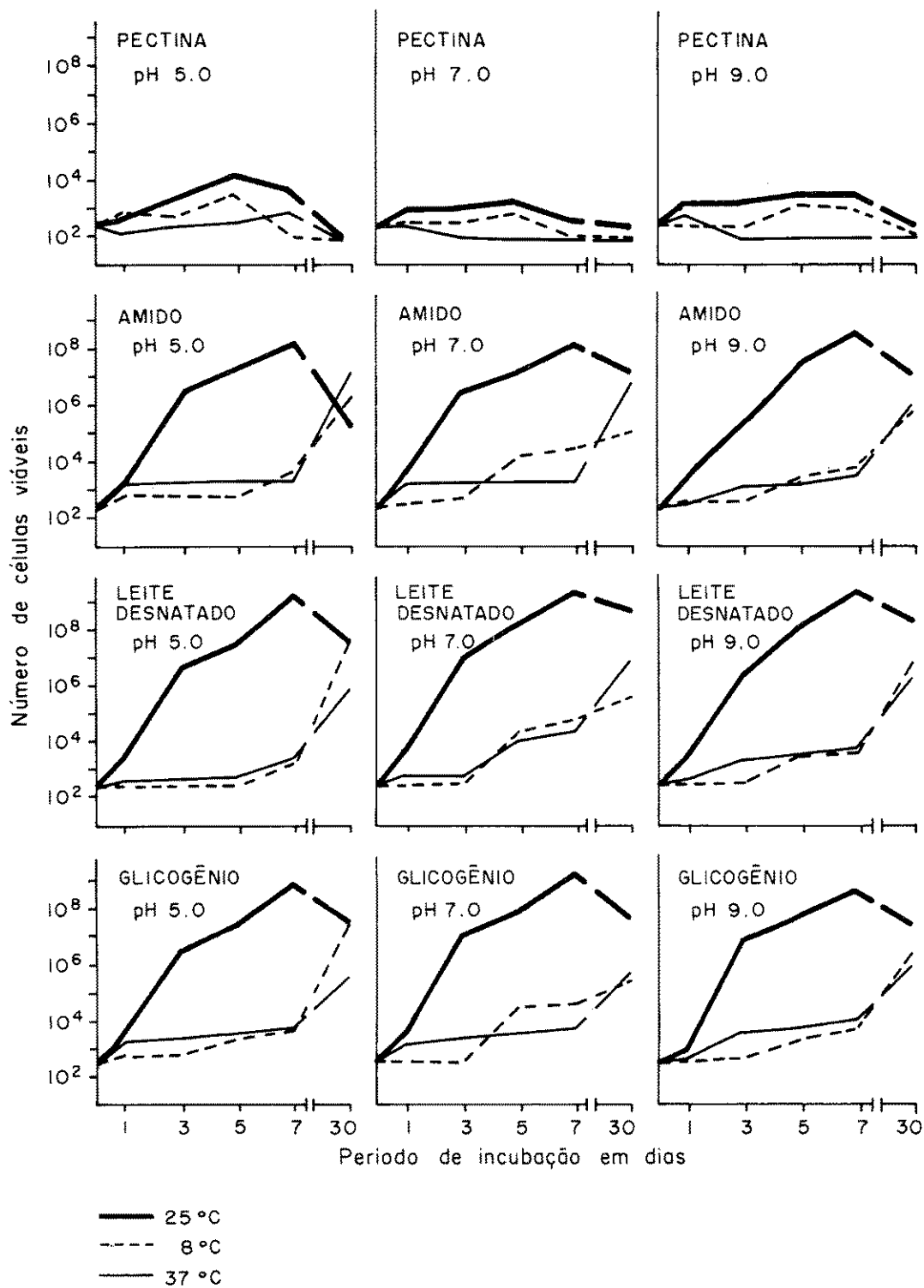


FIGURA 2 — Gráficos de avaliação de crescimento da *Y. enterocolitica* frente a diversos substratos em diferentes pH.

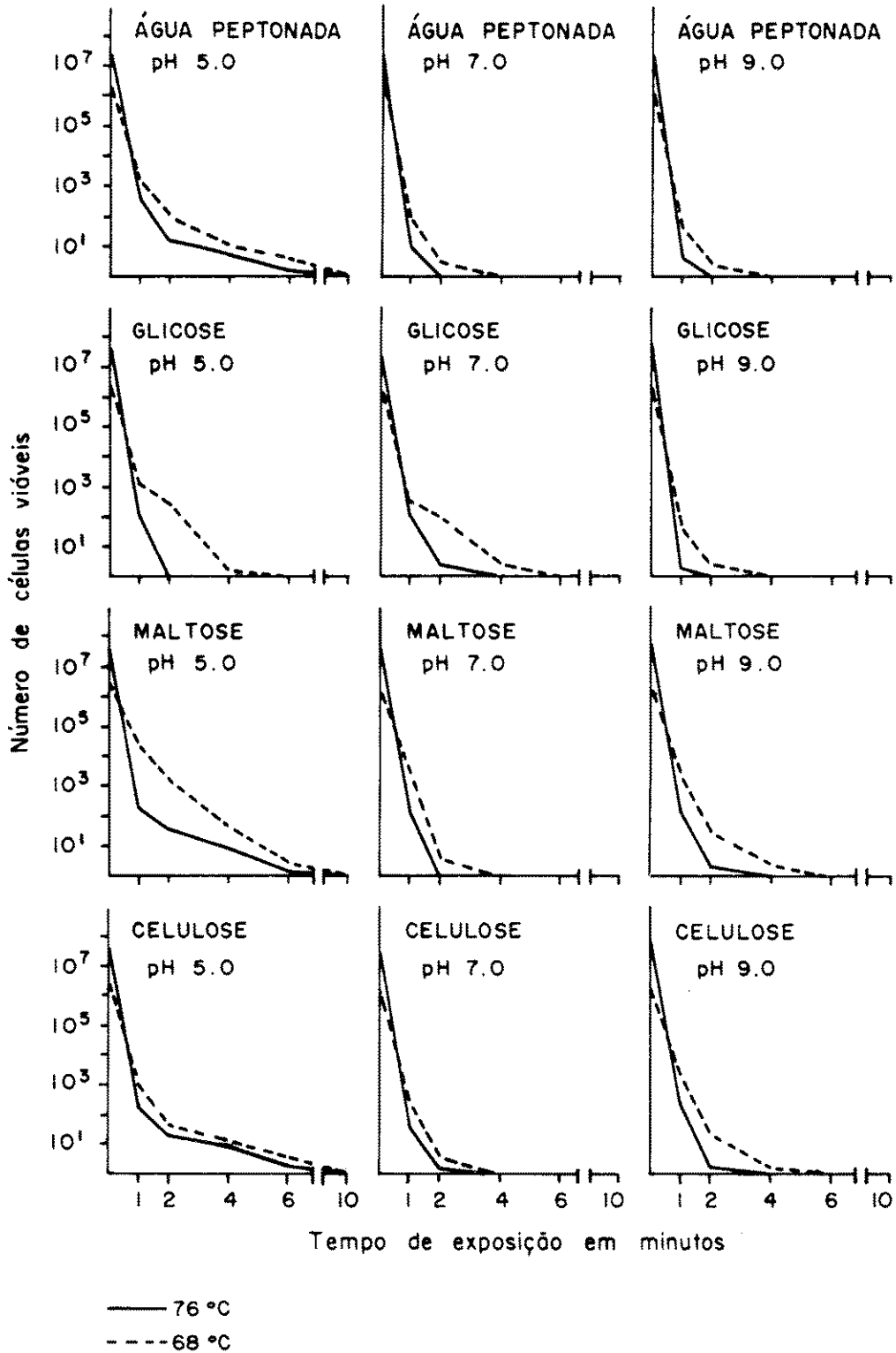


FIGURA 3 — Gráficos de avaliação de termo-resistência da *Y. enterocolitica* frente a diversos substratos em diferentes pH.

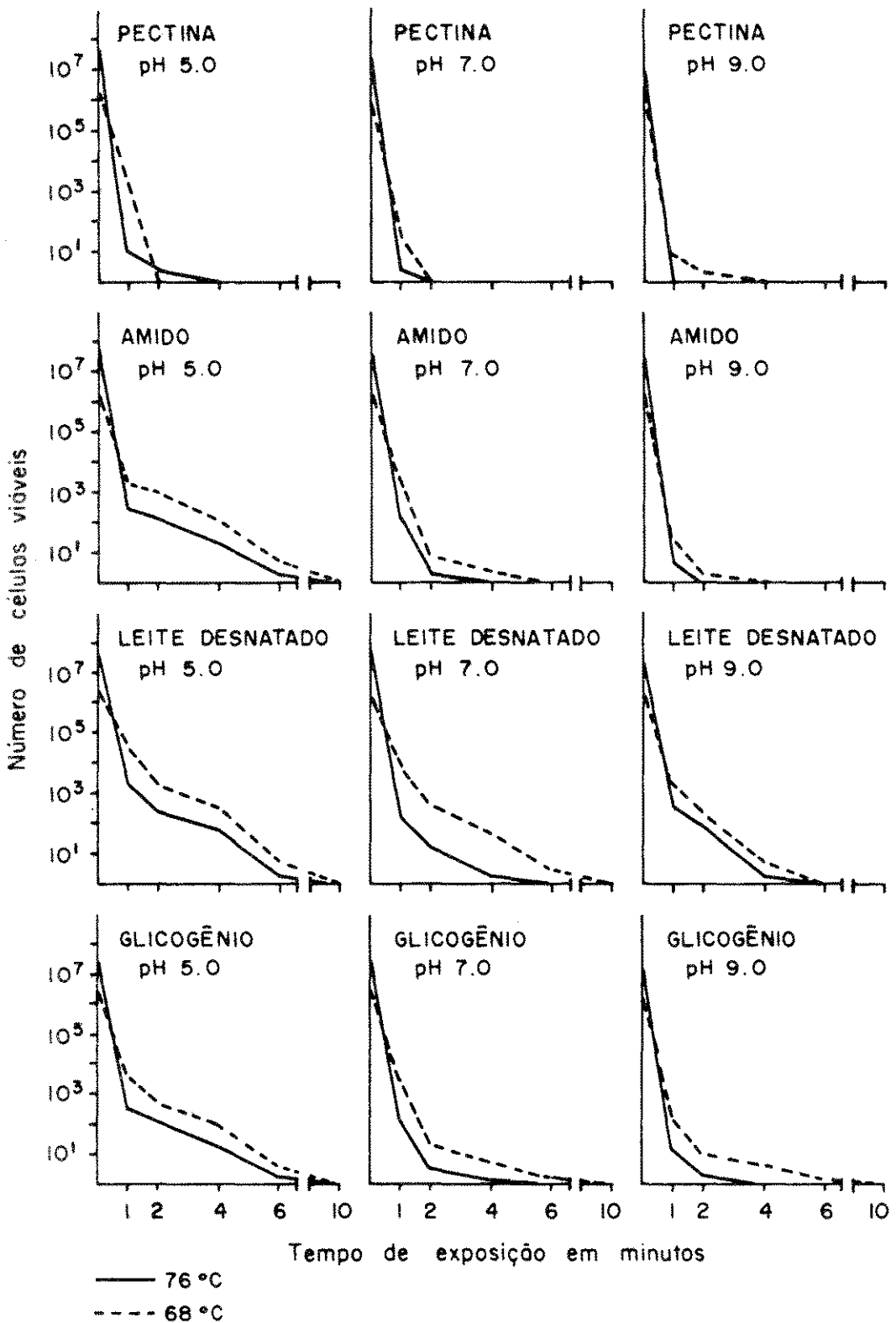


FIGURA 4 — Gráficos de avaliação de termo-resistência da *Y. enterocolitica* frente a diversos substratos em diferentes pH.

## CONCLUSÕES

Os substratos usados estão relacionados com alguns dos elementos presentes nos alimentos. É importante assinalar que pode ocorrer ação sinérgica entre estes elementos e o pH do produto, influinto positiva ou negativamente no desenvolvimento e na termo-resistência da *Y. enterocolitica*. Entretanto faltam observações referentes às substâncias de natureza lipídica.

A recuperação da célula após o tratamento térmico, apesar de aspecto bem caracterizado considerado para o isolamento de *Salmonella* sp., a partir de alimentos que sofreram tratamento térmico, tem implicações adicionais no que diz respeito à *Y. enterocolitica*, também agente de toxi-infecções alimentares, ma vez que esta é capaz de se multiplicar a temperatura de geladeira (de 0 a 8°C), apesar de ocorrer uma diminuição marcante o número de células viáveis após um minuto

de exposição às temperaturas testadas, úteis no processo de pasteurização, é preciso considerar que a efetividade deste processo depende também do número inicial de células presentes, da natureza do produto e do seu pH, assim como das condições de manutenção do produto acabado.

Os resultados fornecidos por este e pelos trabalhos de HANNA *et alii*<sup>3, 4, 5</sup> complementam-se e as pequenas diferenças justificam-se: as cepas testadas não são as mesmas, as observações do presente trabalho se estenderam por 30 dias, e há pequenas variações na metodologia empregada.

As informações apresentadas devem ser consideradas no que diz respeito aos processos tecnológicos de obtenção de alimentos e de seu transporte, assim como de conservação de matérias-primas e produtos acabados; além disso, permitem avaliar o comportamento da *Y. enterocolitica* frente às variáveis testadas.

RIALA6/539

GELLI, D.S. — *Yersinia enterocolitica*, serotype O<sub>3</sub>; growth and thermoresistance. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):9-16, 1982.

**ABSTRACT:** The influence of substracts at pH 5.0, 7.0 and 9.0 and incubation temperatures on the growth and thermoresistance of a strain of *Yersinia enterocolitica* serotype O<sub>3</sub> was observed. For assessing growth after inoculation of a given number of viable cells, cultures were observed at the end of 1, 3, 5, 7 and 30 days. At -15°C there was no multiplication, although the germ was viable; at 42°C, it was destroyed before 24 hours; at 25°C, the adaptation period is shorter, as compared with temperatures of 8° and 37°C. At pH 5.0, growth was favored and potato pectins were particularly unfavorable. Temperatures of 68 and 72°C during 1, 2, 3, 4, 6 and 10 minutes was used for the thermoresistance. At pH 5.0, thermoresistance was greater. The presence of protein, sugars and cellulose substracts favored the strain while potato pectins reduced that characteristic. After the latter tests, tubes were incubated at 8°C for days. Some substracts allowed a recovery from the thermal injury.

**DESCRIPTORS:** *Yersinia enterocolitica*, serotype O<sub>3</sub>; *Yersinia enterocolitica*, growth and thermoresistance in some substracts; pH; temperature.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLACK, R.E.; JACKSON, R.J.; TSAI, T.; MEDVESKY, M.; SHAYEGANI, M.; FEELEY, J.C.; MAC LOED, K.I.E. & WAKELEE, A.M. — Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *New Engl. J. Med.*, 298:76-9, 1978.
- FEELEY, J.C.; LEE, W.H. & MORRIS, G.K. — *Yersinia enterocolitica*. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Intersociety Agency Committee on Microbiological Methods for Foods — *Compendium for the microbiological examination of foods*. [Washington, D.C., c1976] p. 351-7.
3. HANNA, M.O.; STEWART, J.C.; CARPENTER, Z.L. & VANDERZANT, C. — Effect of heating, freezing and pH on *Yersinia enterocolitica* like organisms from meat. *J. Food Protect.*, 40:689-92, 1977.
4. HANNA, M.O.; STEWART, J.C.; CARPENTER, Z.L. & VANDERZANT, C. — Heat resistance of *Yersinia enterocolitica* in skim milk. *J. Food Sci.*, 42:1134, 1136, 1977.
5. HANNA, M.O.; STEWART, J.C.; ZINK, D.L.; CARPENTER, Z.L. & VANDERZANT, C. — Development of *Yersinia enterocolitica* on raw and cooked beef and pork at different temperatures. *J. Food Sci.*, 42:1180-4, 1977.

6. HIGSMITH, A.K.; FEELEY, J.C.; SKALIY, P.; WELLS, J.G. & WOOD, B.T. — Isolation of *Yersinia enterocolitica* from well water and growth in distilled water. *Appl. environ. Microbiol.*, 34:745-50, 1977.
7. MOLLARET, H.H. — Un domaine pathologique nouveau: l'infection à *Yersinia enterocolitica*. *Ann. Biol. clin.*, 30:1-6, 1976.
8. MOLLARET, H.H. & CHEVALIER, A. — Contribution a l'étude d'un nouveau group de germes proches du bacille de Malassez et Vignal. I. Caractères culturaux et biochimiques. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 107:121-7, 1964.
9. MOLLARET, H.H. & LUCAS, A. — Sur les particularites biochimiques des souches de *Yersinia enterocolitica* isolées chez les lièvres. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 108:121-5, 1965.
10. MORRIS, G.K. & FEELEY, J.C. — *Yersinia enterocolitica*: a review of its role in food hygiene. *Bull. WHO*, 54:79-85, 1976.
11. SCHIEMANN, D.A. & TOMA, S. — Isolation of *Yersinia enterocolitica* from raw milk. *Appl. environ. Microbiol.*, 35:54-8, 1978.

Recebido para publicação em 20 de julho de 1981.



## FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS PARA O VÍRUS DA INFLUENZA TIPO C EM HABITANTES DA CIDADE DE SÃO PAULO \*

Heloisa Helena Barbosa MELLES \*\*  
Sueko TAKIMOTO \*\*

RIALA6/540

MELLES, H.H.B. & TAKIMOTO, S. — Frequência de anticorpos para o vírus da influenza tipo C em habitantes da cidade de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):17-20, 1982.

**RESUMO:** Foi realizado inquérito sorológico para verificar a frequência de anticorpos para o vírus da influenza tipo C em soros de habitantes da cidade de São Paulo. Das 651 amostras de soros estudadas, 324 foram colhidas em 1978 e 327 em 1979. Todas as amostras eram de pessoas sem sintomas respiratórios aparentes, que procuraram o Instituto Adolfo Lutz para exames de rotina, provenientes de diferentes bairros da cidade. Estes soros foram examinados através da reação de inibição de hemaglutinação para demonstrar a presença de anticorpos para o vírus da influenza tipo C. Do total de soros examinados resultou que 68,6% apresentavam anticorpos inibidores da hemaglutinação para esse vírus, permitindo inferir que o vírus da influenza tipo C está presente, isto é, circula entre nós, em porcentagens semelhantes às encontradas em outros países. Com exceção do grupo etário de 0-4 anos e do grupo de igual ou maior que 60 anos, em que os resultados foram inferiores em 1979, em relação aos de 1978, os demais grupos não mostraram diferenças entre os dois anos estudados.

**DESCRITORES:** influenza, tipo C, anticorpos em soro humano de habitantes da cidade de São Paulo; orthomyxovirus, influenza tipo C.

### INTRODUÇÃO

O vírus da influenza tipo C foi isolado pela primeira vez em 1947 por Taylor, que denominou a amostra de n.º 1233. Posteriormente, em 1950, FRANCIS *et alii* isolaram outra cepa de vírus, também não relacionada com os outros vírus da influenza até então conhecidos, e denominaram esta nova amostra de JJ. Verificou-se mais tarde que as amostras 1233 e JJ eram antigenicamente relacionadas e, por suas características diferentes, foram denominadas de vírus da influenza tipo C.

A diferença entre o receptor para o vírus da influenza C e para os outros vírus da influenza foi verificado primeiramente por HIRST, em 1950<sup>4</sup>. Recentemente, KENDAL<sup>7</sup> confirmou a perda do efeito da neuraminidase nos receptores celulares para o vírus da influenza tipo C e verificou, também, que os

receptores para o vírus da influenza C não contêm ácido siálico, e que a atividade de destruição dos receptores para esse vírus não é dada pela neuraminidase.

Estudos visando verificar os níveis de anticorpos para o vírus da influenza C têm sido realizados por diversos autores<sup>5, 8, 9</sup>; assim é que JENNINGS<sup>5</sup>, estudando a incidência de anticorpos para os vírus da influenza tipos B e C em soros de jamaicanos, encontrou anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da influenza C em 60% dos soros estudados.

MINUSE *et alii*<sup>8</sup>, em 1954, estabeleceram métodos de isolamento, características hemaglutinantes com várias espécies de hemácias, adsorção e eluição por hemácias de galinha, adaptação em animais, e realizaram estudos sorológicos em crianças.

\* Realizado na Seção de Vírus Respiratórios, Entéricos e Outros do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

O vírus da influenza tipo C, embora normalmente pareça causar infecções respiratórias brandas no ser humano<sup>8</sup>, por vezes, pode estar associado a infecções mais sérias em crianças. Geralmente as infecções por esse vírus são esporádicas; entretanto, são conhecidos alguns surtos epidêmicos<sup>2, 3, 9</sup>.

Em revisão da literatura especializada, não encontramos qualquer estudo sobre esse vírus, em nosso meio, razão pela qual foi realizado este trabalho, tendo em vista determinar a freqüência de anticorpos para o vírus da influenza C em habitantes da cidade de São Paulo, através de inquérito sorológico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Vírus

A amostra usada foi a Taylor do vírus da influenza C, cedida pela Dra. M. S. Pereira do "Virus Reference Laboratory of the Central Public Health Laboratory" de Londres, Inglaterra.

### Soros

Em 1978 e 1979 foram colhidas respectivamente em cada ano, 324 e 327 amostras de soro de pessoas sem sintomas respiratórios aparentes que eram encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz para exames variados, obtenção de carteiras de saúde e alistamento militar. Todos os soros eram separados com assepsia e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### Reação de inibição de hemaglutinação

*Antígeno:* Foi obtido através de passagens sucessivas do vírus na cavidade amniótica de ovos embrionados de galinha que foram incubados a  $35^{\circ}\text{C}$ , por 72 horas. Após colheita do líquido amniótico, foi realizada reação de hemaglutinação para determinar a unidade hemaglutinante.

*Reação:* Os soros foram inativados a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos e a técnica utilizada foi a microtécnica em placas. Foram feitas diluições seriadas do soro, a partir de 1:5, no volume de 0,025 ml ao qual se adicionou mesmo volume de antígeno, contendo 4 unidades hemaglutinantes. A mistura soro-vírus foi deixada a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos, após o que lhe foram adicionados 0,05 ml de suspensão de hemácias de galinha, a 0,5%. A leitura foi feita após 30 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . O título final foi tomado como a mais alta diluição do soro que inibiu completamente a hemaglutinação. Os soros que demonstraram inibição da hemaglutinação a partir da diluição inicial de 1:5 foram considerados positivos, isto é, com presença de anticorpos.

## RESULTADOS

Das 651 amostras de soros examinados pela reação de inibição de hemaglutinação para determinar a presença de anticorpos para o vírus da influenza C, 447 amostras foram positivas, ou seja, 68,6% demonstraram inibição de hemaglutinação na diluição igual ou maior que 1:5.

Na tabela abaixo mostramos os soros distribuídos segundo os grupos etários nos anos 1978 e 1979, com os respectivos totais de positivos, e porcentagens de cada grupo separadamente.

De interesse, pode-se verificar que em 1978 o número de soros positivos na faixa etária até 4 anos foi superior ao encontrado em 1979 e que entre as pessoas com idade igual ou superior a 60 anos foi encontrado número de soros positivos menor em 1979 que em 1978. Embora haja as naturais variações entre os grupos etários, no cômputo geral não houve diferença quanto à freqüência de anticorpos para o vírus da influenza tipo C entre os dois anos estudados.

## TABELA

Resultado geral dos soros examinados nos anos 1978 e 1979 segundo os grupos etários

Grupos etários	1978			1979		
	Soros examinados n.º	Soros positivos		Soros examinados n.º	Soros positivos	
		n.º	%		n.º	%
≤ 4	18	6	33,3	26	4	15,3
5 — 9	27	14	51,8	36	18	50,0
10 — 19	49	33	67,3	72	54	75,0
20 — 29	58	46	79,3	78	60	83,3
30 — 39	54	40	74,0	46	33	71,7
40 — 49	62	47	75,8	27	21	77,7
50 — 59	36	27	75,0	27	21	77,7
≥ 60	20	15	75,0	15	8	53,3
Total	324	228	—	327	219	—

Dos resultados, constatou-se também que a distribuição de soros positivos é mais ou menos uniforme entre os diversos grupos etários, a partir de 10 anos.

Consideramos como sendo positivo, isto é, contendo anticorpos anti-hemaglutinantes, os soros com título igual ou superior a 1:5 na reação de inibição de hemaglutinação, porque verificamos que não havia diferença no título de anticorpos antes e depois do tratamento com RDE, enzima usada para retirar os inibidores inespecíficos para os vírus da influenza A e B, presentes no soro humano e de animais. Quisemos confirmar o fato demonstrado por STYK<sup>10</sup> de que só existe inibidor inespecífico para o vírus da influenza C no soro normal de rato, enquanto que, para os outras membros do grupo, isto é, influenza A e B, não existe inibidor inespecífico no soro normal de rato.

A distribuição dos soros positivos em relação aos títulos obtidos foi a seguinte: 139 soros demonstraram título de 1:5; 166 demonstraram título de 1:10; 107, de 1:20; 29, de 1:40 e finalmente 6 soros demonstraram título de 1:80.

É necessários lembrar que as dosagens dos anticorpos para influenza C são altamente específicas, pois o vírus padrão de influenza C não cruza com nenhum outro mixovírus e a reação de inibição de hemaglutinação serve exatamente para a classificação da influenza em tipos e subtipos, tal a sua especificidade.

#### DISCUSSÃO

Dos resultados obtidos neste trabalho, verificamos que em São Paulo, de modo análogo ao que ocorre com o vírus influenza tipo A, o vírus da influenza tipo C também causa infecção na infância, o que é consubstanciado pelo dado obtido, isto é, 48,6% de soros de crianças de 0-4 anos com anticorpos para esse vírus.

Nossos dados relativos à influenza tipo C são semelhantes aos observados por DAVENPORT *et alii*<sup>1</sup> em estudo epidemiológico da dis-

tribuição, por grupos etários, dos anticorpos correspondentes às variantes do vírus influenza. Demonstrou esse autor que os anticorpos correspondentes ao vírus da influenza C estão presentes na infância e se mantêm em altos títulos ao longo da vida e que, embora o isolamento seja pouco freqüente, a infecção por esse vírus ocorre comumente na infância.

A observação de que houve distribuição mais ou menos uniforme nas porcentagens de soros positivos dentro dos diferentes grupos etários, com exceção da faixa com menos de 10 anos, concorda plenamente com os resultados obtidos por JENNINGS<sup>5</sup>, em 1968, num estudo sorológico da incidência de anticorpos para o vírus da influenza B e C nos soros de jamaicanos. Este autor verificou que 60% dos soros examinados inibiam a hemaglutinação para o vírus da influenza tipo C, verificando, ainda, que a porcentagem de soros positivos era menor em idades menores que 10 anos e era maior em indivíduos da faixa de 10-14 anos. Ainda, segundo o citado autor, o fato de o nível de anticorpos se manter ao longo da vida, seria sugestivo de que as reinfecções e infecções subclínicas seriam freqüentes, explicando assim a alta incidência de anticorpos para esse vírus. Consubstanciando ainda mais nossos dados, há o trabalho de MINUSE *et alii*<sup>8</sup>, os quais em estudo sorológico em crianças, durante uma epidemia de influenza, verificaram que, de 68 crianças estudadas, 52 mostravam aumento de anticorpos para o vírus da influenza tipo C.

Sendo nossos resultados similares aos encontrados em outros países, podemos inferir, baseados na especificidade do método usado, que o vírus da influenza tipo C circula, isto é, está presente em nosso meio, sujeito às condições epidemiológicas gerais, entre as quais a suscetibilidade ou imunidade do indivíduo à infecção.

#### Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Luís Florêncio de Salles Gomes pela colaboração prestada na revisão e correção deste trabalho.

RIALA6/540

MELLES, H.H.B. & TAKIMOTO, S. — Antibodies to influenza virus type C in inhabitants of São Paulo City. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):17-20, 1982.

**ABSTRACT:** Hemagglutination-inhibition tests were carried out in 651 human sera for the detection of antibodies to type C influenza virus. Of 324 and 327 sera collected respectively in 1978 and 1979, from individuals without evidence of respiratory infection, 68.6% showed positive results. There was no important difference between the two years, except in the 0-4 year age group and in persons older than 60 years. In these two age groups, the frequency of positive findings was 15.3% and 53.3%, respectively for the 1979 sera while in the 1978 sera, the frequency was 33.3% and 75.0%, respectively.

**DESCRIPTORS:** influenza virus; orthomyxovirus type C, human; antibodies in human sera, São Paulo City, Brazil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DAVENPORT, F.M.; HENNESSY, A.V. & FRANCIS, JR, T. — Epidemiologic and immunologic significance of age distribution of antibody to antigenic variants of influenza virus. *J. exp. Med.*, 98:641-56, 1953.
2. DeMEIO, J.L.; WOOLRIDGE, R.L.; WHITE-SIDE, J.E. & SEAL, J.R. — Epidemic influenza B and C in navy recruits, 1953-1954. II. Antigenic studies on influenza virus, type C. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 88:436-8, 1955.
3. GERBER, P.; WOOLRIDGE, R.L.; SEAL, J.R. & ZIEGRA, S.R. — Epidemic influenza B and C in navy recruits during winter of 1951-52. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 81:624-8, 1952.
4. HIRST, G.K. — The relationship of the receptors of a new strain of virus to those of the mumps-NDV-influenza group. *J. exp. Med.*, 91:177-84, 1950.
5. JENNINGS, R. — Respiratory viruses in Jamaica: a virologic and serologic study. 3. Hemagglutination-inhibiting antibodies to type B and C influenza viruses in the sera of Jamaicans. *Amer. J. Epidemiol.*, 87:440-6, 1968.
6. JOOSTING, A.C.C.; HEAD, B.; BYNOE, M.L. & TYRRELL, D.A.J. — Production of common colds in human volunteers by influenza C virus. *Brit. med. J.*, 4(5622): 153-4, 1968.
7. KENDAL, A.P. — A comparison of "influenza C" with prototype myxoviruses: receptor-destroying activity (neuraminidase) and structural polypeptides. *Virology*, 65:87-9, 1975.
8. MINUSE, E.; QUILLIGAN, JR., J.J. & FRANCIS, JR., T. — Type C influenza virus. I. Studies of the virus and its distribution. *J. Lab. clin. Med.*, 43:31-42, 1954.
9. STYK, B. — An epidemic outbreak of influenza caused by influenza C virus. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunol.*, 6: 68-75, 1959.
10. STYK, B. — Non-specific inhibitors in normal rat serum for the influenza C type virus: the relation between the influenza C type virus, Newcastle disease and epidemic parotitis. *Folia biol.*, Prague, 1: 207-13, 1955.

Recebido para publicação em 5 de outubro de 1981.

## VERIFICAÇÃO DA MIGRAÇÃO GLOBAL NOS DIFERENTES TIPOS DE EMBALAGENS PARA ALIMENTOS QUANDO SUBMETIDOS A PROVAS DE CESSÃO POR PERÍODO PROLONGADO \*

Lúcia Tieco Fukushima MURATA \*\*  
Neusa Santesso GARRIDO \*\*  
Neus Pascuet PREGNOLATTO \*\*

RIALA6/541

MURATA, L.T.F.; GARRIDO, N.S. & PREGNOLATTO, N.P. — Verificação da migração global nos diferentes tipos de alimentos quando submetidos a provas de cessão por período prolongado. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):21-25, 1982.

**RESUMO:** Foram analisadas 49 amostras de embalagens compreendendo embalagens metálicas revestidas com vernizes ou esmaltes sanitários, e plásticas, para verificar seu comportamento quando submetidas a provas de cessão por períodos de tempo de 10 e 40 dias. Verificou-se que as embalagens metálicas revestidas sofrem mais a ação do tempo que as embalagens de plásticos moldados, filmes e laminados plásticos, sendo estas últimas portanto mais adequadas para o acondicionamento de alimentos de maior vida-de-prateleira.

**DESCRIPTORIOS:** embalagens metálicas para alimentos, análise; embalagens plásticas para alimentos, análise; plásticos, embalagens para alimentos, análise; alimentos, embalagens, análise.

### INTRODUÇÃO

O grande avanço na tecnologia dos aditivos utilizados na indústria de alimentos, principalmente na área de conservadores e estabilizantes, resultou em um acréscimo no tempo de conservação dos alimentos nas mais diversas condições ambientais. Desnecessário se faz citar os grandes benefícios que este fato acarretou. Nestas novas condições, mesmo em regiões de clima desfavorável, pode-se adquirir uma grande variedade de produtos vegetais e animais que seria impossível obter em outras épocas.

Para o armazenamento destes alimentos muito contribuíram os novos tipos de materiais de embalagem desenvolvidos nestas últimas décadas, principalmente depois da última grande guerra.

O armazenamento adequado e a longo prazo de gêneros alimentícios tem uma enorme im-

portância econômica, pois atua na redução das flutuações de preço na entressafra, e nos casos de superprodução, proporcionando estabilidade na oferta com reflexos na manutenção dos preços.

A embalagem é importante no processo de transporte de alimentos a grandes distâncias, porque facilita o abastecimento a países longínquos <sup>4</sup>.

Uma das funções da embalagem é entregar ao consumidor um alimento com o mesmo nível de qualidade dos alimentos frescos ou recém-preparados, em função de sua capacidade de protegê-los contra os agentes deteriorantes, infectantes e sujidades.

Uma boa embalagem deve também ser resistente ao produto nela contido durante o processamento e/ou armazenamento, não cedendo elementos de sua composição ao alimento, sejam estes nocivos ou não ao homem ou ao

\* Realizado na Seção de Plásticos, Vernizes e Outros Materiais de Embalagem do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

próprio alimento. Deve ainda satisfazer a diversas outras condições, como por exemplo: ser impermeável a gases e vapor d'água, em função da vida-de-prateleira do alimento, ser de baixo custo, apresentar boa resistência mecânica e permitir boa apresentação do produto.

O uso de embalagens para alimentos em nosso país está devidamente regulamentado através de resoluções da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde<sup>1, 2, 3</sup>.

A Resolução 45/77 da CNNPA<sup>3</sup> regulamenta o uso de polímeros, resinas e respectivos aditivos utilizados na produção, transporte, armazenamento e acondicionamento de alimentos e bebidas, incluindo os vernizes, e estabelece os tipos de testes a que devem ser submetidas as embalagens, e as condições em que tais testes devem ser efetuados.

Estes testes, designados provas de cessão, têm a finalidade de verificar a quantidade de substâncias passíveis de migrar do recipiente para o alimento, e a importância desta determinação prende-se ao fato de que estes migrantes, além de potencialmente tóxicos ao homem, podem alterar as características do alimento.

Essas provas realizadas com solventes apropriados tentam, na medida do possível, simular as condições a que tanto a embalagem quanto o produto embalado serão submetidas, em função do tipo de alimento, do tempo de contato e da temperatura.

O tempo máximo de contato estabelecido na Resolução 45/77 da CNNPA<sup>3</sup> entre os solventes simulantes e a embalagem é de 10 dias. Como os alimentos envasados e hermeticamente fechados possuem vida-de-prateleira muito mais longa e, uma vez que nestes se verifica, com alguma frequência, variações nas características do alimento, e na embalagem anteriormente analisada e apta para tal fim, levantou-se a possibilidade de o tempo de contato legalmente estabelecido não ser suficiente para simular as condições a que estará sujeito o alimento, durante sua estocagem.

O objetivo deste trabalho é verificar o comportamento dos diferentes tipos de embalagem quando submetidos a provas de cessão por um período mais prolongado que o exigido por lei e, a partir dos dados obtidos, discutir a validade dos testes no período de 10 dias.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram selecionadas 49 amostras de embalagens de composições diferentes, assim distribuídas: 8 de laminados plásticos, 7 de plásticos moldados, 8 de filmes plásticos e 26 de metal revestido com vernizes os esmaltes sanitários.

Como os alimentos que têm uma vida-de-prateleira maior são geralmente acondicionados em embalagens metálicas revestidas com vernizes e esmaltes sanitários, procurou-se testar em maior escala estes materiais.

O método utilizado foi o descrito no anexo IV da Resolução 45/77 da CNNPA<sup>3</sup> que classifica os alimentos em seis tipos-base diferentes, ou seja: alimentos do tipo I (aquosos não ácidos), solvente simulante, água destilada; tipo II (aquosos ácidos), solvente simulante, solução aquosa de ácido acético a 3%, p/v; tipo III (aquosos ácidos ou não contendo óleo ou gordura), solventes simulantes, água destilada, solução aquosa de ácido acético a 3%, p/v e n-heptano; tipo IV (oleosos e gorduras), solvente simulante, n-heptano; tipo V (alcoólicos), solvente simulante, solução aquosa de álcool etílico a 50%, v/v; tipo VI (sólidos secos), sem solvente simulante.

Provas de cessão foram efetuadas em amostras do mesmo material nas mesmas condições, mas em períodos de contato de 10 e 40 dias, com exceção das provas feitas com o solvente n-heptano, utilizado para as provas de cessão dos tipos III e IV, cujo tempo de contato previsto na Resolução 45/77 da CNNPA<sup>3</sup> é de 30 minutos; o teste de período prolongado foi efetuado durante 2 horas.

Para os alimentos do tipo III foram efetuadas provas de cessão, usando-se como solventes simulantes água destilada, solução aquosa de ácido acético, a 3%, e n-heptano, e o resíduo foi calculado como a média aritmética das três provas de cessão.

A temperatura escolhida foi a de 40°C, pois a maioria dos produtos embalados são estocados e comercializados à temperatura ambiente, como previsto na tabela I do anexo IV da Resolução 45/77 da CNNPA<sup>3</sup>.

## RESULTADOS

Na tabela da página seguinte estão os valores médios dos resíduos obtidos nas provas de 10 e 40 dias, para os diferentes tipos de amostra utilizados.

Analisando-se as médias dos resultados apresentados, nota-se que as embalagens metálicas revestidas com vernizes e esmaltes sanitários foram as que mais sofreram a ação do tempo, e as menos atingidas foram as de filmes plásticos.

Nas embalagens de plásticos moldados, laminados e filmes plásticos, as diferenças dos resíduos obtidos nos testes de 10 e 40 dias são significativas, mas na maioria dos casos não ultrapassaram o valor de 8 mg/dm<sup>2</sup>, que é o máximo tolerado legalmente. Por outro lado, nos testes de tempo prolongado, todas as embalagens metálicas revestidas liberaram teores de resíduo acima dos limites estabelecidos na regulamentação.

TABELA

Resultados obtidos nas provas de cessão dos diferentes materiais analisados

Materiais analisados	Número de amostras	Média dos resíduos nas provas de cessão									
		Solventes simulantes utilizados*									
		Tipo I		Tipo II		Tipo III		Tipo IV		Tipo V	
		10 dias	40 dias	10 dias	40 dias	10 dias	40 dias	30 minutos	2 horas	10 dias	40 dias
Laminados plásticos	8	0,8	2,9	1,9	3,9	1,4	3,0	1,6	2,2	0,7	2,8
Produtos moldados	7	2,3	4,2	2,5	3,9	1,9	4,3	1,0	4,9	2,7	4,0
Filmes plásticos	8	0,9	2,0	1,4	1,9	0,9	1,9	0,3	1,9	1,1	5,4
Embalagens metálicas revestidas	26	1,9	32,5	45,5	472,9	17,5	174,5	0,3	0,8	3,1	36,1

\* Solventes simulantes:

Tipo I — água destilada

Tipo II — solução aquosa de ácido acético a 3% p/v

Tipo III — água destilada, solução aquosa de ácido acético a 3%, p/v e n-heptano

Tipo IV — n-heptano

Tipo V — solução aquosa de álcool etílico a 50% v/v

MURATA, I.T.F.; GARRIDO, N.S. & PREGNOIATTO, N.P. — Verificação da migração global nos diferentes tipos de embalagens para alimentos quando submetidos a provas de cessão por período prolongado. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):21-25, 1982.

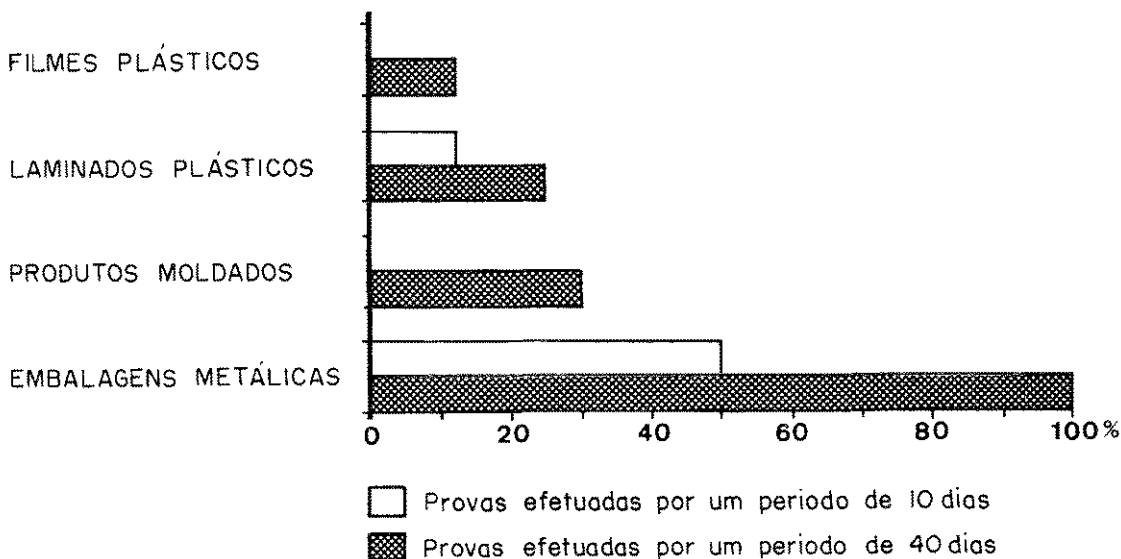


FIGURA — Porcentagem de amostras com resíduo acima do limite permitido pela legislação brasileira ( $8 \text{ mg/dm}^2$ ).

O teor mínimo de resíduo liberado nas amostras analisadas foi encontrado numa embalagem de laminado com valor de  $0,1 \text{ mg/dm}^2$  para o tipo IV, e o máximo, numa de metal revestida para o tipo II, com o valor de  $3.000 \text{ mg/dm}^2$ .

De acordo com a figura acima, todas as embalagens metálicas revestidas de verniz ou esmalte sanitário não satisfizeram as exigências da Resolução 45/77 da CNNPA<sup>3</sup> e da Resolução 8/75 da CNNPA<sup>1</sup>, quando o tempo de teste foi prolongado, e 50% destas embalagens não passaram nos testes de 10 dias. É interessante notar que justamente estas são usadas para embalar produtos alimentícios de maior vida-de-prateleira.

A maior taxa de migração verificada ocorreu na prova de cessão para o tipo II, isto é, quando se usou solvente aquoso ácido. Paradoxalmente, verifica-se que a maioria dos alimentos acondicionados em embalagens metálicas revestidas está enquadrado no tipo II, conforme Resolução 35/76 da CNNPA<sup>2</sup>, quer pela sua própria natureza, como no caso de sucos cítricos, quer pelos acidulantes adicionados para baixar o pH (hortaliças em conserva) ou para melhorar o sabor do alimento<sup>5</sup>.

Duas são as causas da baixa resistência e elevado teor de resíduo nas embalagens metálicas revestidas:

a) Recravação posterior à aplicação da película de revestimento, fazendo com que surjam áreas vulneráveis dentro da embalagem, podendo ainda ocorrer a remoção mecânica da película em alguns pontos.

b) Presença de oxigênio no interior da embalagem que pode ser responsável, em alguns casos, por perfurações e estufamentos, além de favorecer a dissolução dos metais devido ao efeito despolarizante nas reações galvânicas de corrosão. O enchimento da embalagem em baixas temperaturas, isto é, sem provocar o "vácuo relativo", é o fator responsável pela não diminuição da concentração de oxigênio.

## CONCLUSÃO

A migração apresentada pelas embalagens metálicas revestidas com verniz ou esmalte sanitário é muito superior ao limite tolerável pela legislação brasileira, quando o período de contato foi prolongado para 40 dias.



A variação da migração em embalagens de plásticos moldados, filmes e laminados plásticos não é significativa quando se prolonga o tempo de contato para 40 dias.

As indústrias, ao projetarem uma embalagem para entrar em contato com alimentos, não levam em conta a migração de substâncias indesejáveis da embalagem para o mesmo, tendo em vista somente fatores econômicos e mecânicos.

Seria conveniente que se restringisse o uso de embalagens metálicas revestidas, no caso

de acondicionamento de alimentos ácidos de maior vida-de-prateleira.

É recomendável também que se faça uma revisão no que se refere aos tempos de contato nas provas de cessão descritos pela Resolução 45/77 da CNNPA<sup>3</sup>.

#### Agradecimentos

Ao Dr. Waldomiro Pregnolato, Diretor da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, por idéias e sugestões recebidas durante a realização deste trabalho.

RIALAG/541

MURATA, L.T.F.; GARRIDO, N.S. & PREGNOLATTO, N.P. — Determination of global migration in various foods stored in metallic or plastic containers. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):21-25, 1982.

ABSTRACT: Forty-nine samples of containers including metallic ones coated with varnish or sanitary enamel and plastic containers were examined for behavior during extraction tests lasting 10 to 40 days. Coated metallic containers wore out more than containers of molded plastic, plastic film or laminated plastic. Plastic containers seem to be more suitable for packing foods with a longer shelf life.

DESCRIPTORS: food containers, metallic, analysis; food containers, plastic, analysis; plastics for food containers, analysis; containers for food, analysis.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução n.º 8/75. *Diário Oficial*, Brasília, 26 jun. 1975. Seção I, pt. I, p. 7547. Dispõe quanto às substâncias e materiais que poderão ser empregados no fabrico de recipientes ou utensílios destinados a entrar em contato com alimentos...
2. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução 35/76. *Diário Oficial*, Brasília, 4 mar. 1977. Seção I, pt. I, p. 2526-8. Dispõe sobre o critério de avaliação da compatibilidade de artigos destinados a entrar em contato direto com alimentos...
3. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução 45/77. *Diário Oficial*, Brasília, 1 fev. 1978. Seção I, pt. I, p. 1781-95. Aprova as listas de polímeros, resinas e respectivos aditivos e regulamenta o seu emprego na elaboração ou revestimento de embalagens...
4. HEISS, R. — *Principios de envasado de los alimentos: guía internacional*. Trad. del inglés por Justino Burgos Gonzalez & Francisco Sala Trepas. Zaragoza, Editorial Acribia [1977]. p. 23-5.
5. SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. — Decreto n.º 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p. 12 e p. 15. (NTA 24 e NTA 31). Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas...

Recebido para publicação em 16 de outubro de 1981.



## ENCEFALITE HERPÉTICA: APRESENTAÇÃO DE UM CASO DEVIDO A *HERPESVIRUS HOMINIS*, TIPO 1\*

Luis F. de SALLES GOMES \*\*  
Carlos E. de SALLES GOMES JR. \*\*\*  
Ângelo SEMENTILLI \*\*\*  
Mary Eiko SAKUMA \*\*  
Eide D. CAMARGO \*\*

RIALA6/542

SALLES GOMES, L.F.; SALLES GOMES JR, C.E.; SEMENTILLI, A.; SAKUMA, M.E. & CAMARGO, E.D. — Encefalite herpética: apresentação de um caso devido a *Herpesvirus hominis*, tipo 1. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):27-34, 1982.

**RESUMO:** São apresentados dados clínicos de um paciente de encefalite herpética do qual foi colhido material do encéfalo para exame histopatológico, por ocasião de lobotomia temporal visando descompressão intracraniana. O exame histopatológico revelou quadro típico de encefalite causada por vírus, com presença de inclusões intranucleares. Foram colhidos materiais para isolamento de vírus no encéfalo e no líquido e titulagens de anticorpos no líquido e no sangue. Foi isolado e identificado o *Herpesvirus hominis*, tipo 1, a partir do encéfalo e do sangue. O exame do líquido demonstrou presença de anticorpos específicos, enquanto que, no sangue não foram encontrados estes anticorpos.

**DESCRIPTORIOS:** encefalite herpética; *Herpesvirus hominis*, tipo 1, isolamento do cérebro e do sangue; encefalite por vírus, diagnóstico histológico.

### INTRODUÇÃO

Das infecções do sistema nervoso central, causadas por vírus, a encefalite herpética por *Herpesvirus hominis* é a mais freqüente, ainda que as informações sobre sua real incidência, patogenia e diagnóstico necessitem de melhor avaliação.

Escrita em 1955 por VAN BOGAERD<sup>26</sup>, com o nome de encefalite aguda necrotizante, ocorre esporadicamente, de forma endêmica, em qualquer grupo etário. O êxito é letal em cerca de 50 a 70% dos pacientes, sendo que os sobreviventes carregam seqüelas geralmente graves. A letalidade em comatosos chega a níveis de 80%<sup>15</sup>.

O diagnóstico clínico da encefalite herpética é difícil pelo fato de que sintomas e sinais não apresentam qualquer especificidade, isto é, são comuns a quaisquer encefalites, não bacterianas ou a outras de etiologia viral.

As alterações do eletroencefalograma não são características desta infecção e os sinais radiológicos evidentes de lesão em expansão destrutiva necrotizante do lobo têmporo-parietal simulam abscesso cerebral ou neoplasia.

Revisões e estudos da encefalite herpética realizados em 42 casos por HAYMACKER<sup>9</sup> (1958), em 15 casos por ADAMS & JENNETT<sup>1</sup> (1967), em 13 casos por NOLAN *et alii*<sup>21</sup> (1970) e, em 51 casos, por LERNER *et alii*<sup>15</sup> (1976),

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

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

\*\*\* Do Hospital Ana Costa, Santos, SP.

enriquecem a literatura especializada sobre os dados clínicos, evolução, tratamento e seqüelas assim como diagnóstico laboratorial, deixando, contudo, dúvidas sobre a real patogenia da infecção, tais como, se a encefalite é resultante de infecção primária ou recorrente, e qual o mecanismo do acesso do vírus ao sistema nervoso central. Faltam, ainda, melhores esclarecimentos sobre a efetividade do uso de substâncias como o IDU e os arabinosídeos, no tratamento da infecção.

O diagnóstico de certeza ou definitivo é feito somente com o isolamento do vírus, ou com a presença do antígeno virótico no cérebro obtido através de biopsia, ato cirúrgico ou durante a autópsia.

Em revisão da literatura especializada nacional, não encontramos qualquer caso de encefalite herpética que satisfizesse os requisitos de confirmação etiológica somados aos de tipagem do agente virótico.

Neste trabalho, apresentamos um caso de encefalite herpética causada pelo *Herpesvirus hominis*, tipo 1, com comprovação diagnóstica em vida. Discute-se o valor dos resultados obtidos à luz dos conhecimentos atuais e a urgência do diagnóstico, tendo em vista as possibilidades de tratamento.

Pede-se maior atenção para esta infecção que pode ser de incidência superior à conhecida.

## APRESENTAÇÃO DO CASO

M. J. S. F., 39 anos, RG. n.º 363.236, branca, casada, natural da Paraíba, procedente de Santos. Internada no Hospital Ana Costa, de 31-5-1980 a 13-6-1980. História de aproximadamente uma semana de internação quando começou a apresentar febre diária, elevada, acompanhada de confusão mental, diminuição da memória e desorientação têmporo-espacial. Concomitantemente, apresentava crise convulsiva no hemisfério esquerdo, tonicoclônica com início no membro superior esquerdo, de duração de minutos. Após dois dias, apresentou cefaléia intensa global acompanhada de náuseas e vômitos em jato.

Deu entrada no Hospital em 31-5-80. Na admissão estava em estado pós-convulsivo, taquipnéica, torporosa, corada, febril (38°C) com PA de 13 x 9 e FC de 120. Rigidez de nuca. Exame físico especial de outros aparelhos sem outras anormalidades.

Ao exame neurológico apresentava-se torporosa, não obedecendo a ordens simples, com hemiparesia esquerda completa, predominando em face e membro superior. Reflexos vivos globalmente mais acentuados à esquerda, com sinal de Babinski, presentes bilateralmente. Ao exame de fundo de olho, foram observados bordos papilares poucos nítidos, com estase venosa. Demais pares cranianos, sem anormalidades.

Apesar do quadro de hipertensão intracraniana, a paciente foi submetida a exame de líquor por punção suboccipital, em virtude da suspeita de doença infecciosa.

O líquor se apresentou hipertenso, límpido e incolor, com 395 células com 100% de linfócitos. Proteínas, glicose e cloretos normais. O exame bacteriológico resultou negativo após bacterioscopia pelos métodos de Gram e Ziehl-Nielsen, e cultura em meios adequados. Hemograma com série vermelha normal, série branca com 8.000 leucócitos, neutrófilos bastonetes 2%, neutrófilos segmentados 78%, linfócitos 20%.

Os Raios X de crânio e tórax apresentaram-se normais.

A cintilografia e angiografia cerebral evidenciaram volumoso processo expansivo frontotemporal direito, com presença de hérnia encefálica transfoveal.

A paciente foi medicada com Decadron (32 mg ao dia), Ampicilina e Hidantoína. Evoluiu com piora rápida do quadro neurológico, tendo sido indicada, então, craniotomia exploradora e descompressiva. A craniotomia ampla frontotemporal direita, encontrou-se a duramáter tensa e não pulsátil. Feita punção temporal, resultou negativa. Optou-se por lobotomia temporal direita. O encéfalo apresentava-se friável com pequenas áreas de necrose e homoganeamente friável e amolecido. Após a lobotomia, o hemisfério tornou-se não tenso com melhor vascularização e pulsátil. Não foi realizada cranioplastia. Nesta ocasião foi separado material para o exame anatomopatológico.

A paciente evoluiu inicialmente com melhoria do nível de consciência, porém, a partir do 3.º dia de pós-operatório, a falha óssea tornou-se extremamente tensa e a paciente evoluiu com piora gradativa, falecendo no 10.º dia pós-operatório.

## ESTUDO ETIOLÓGICO

### *Materiais e métodos*

Vários fragmentos do lobo temporal direito foram incluídos em parafina para exame anatomopatológico. As lâminas resultantes, coradas pela hematoxilina-eosina, foram examinadas ao microscópio comum.

O material submetido a exames virológicos foi colhido no dia 12-6-80 e constou de amostra de líquor cefalorraquiano, sangue e fragmentos de encéfalo obtidos respectivamente por punção suboccipital, punção venosa do antebraço e aspiração com seringa, através da falha óssea feita durante lobotomia temporal direita realizada dois dias antes, visando descompressão cerebral. Estes materiais chegaram ao laboratório em boas condições para exame, sob temperatura de aproximadamente 4°C.

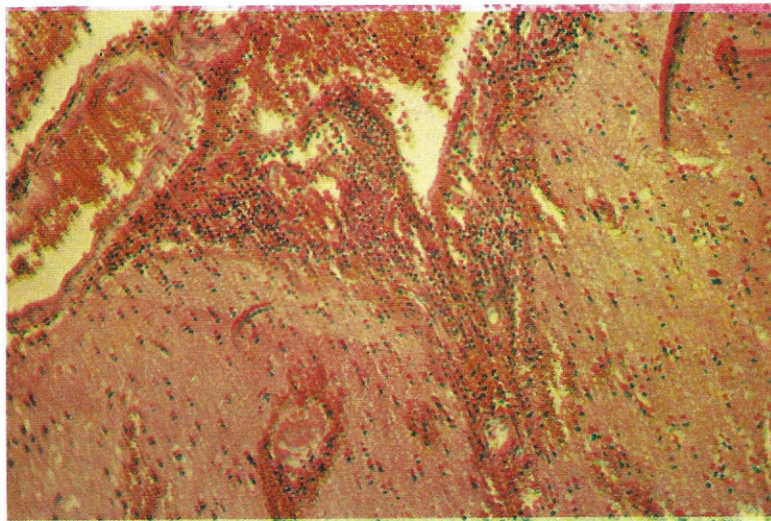


FIGURA 1 — *Encéfalo*: aspecto geral do quadro histológico.

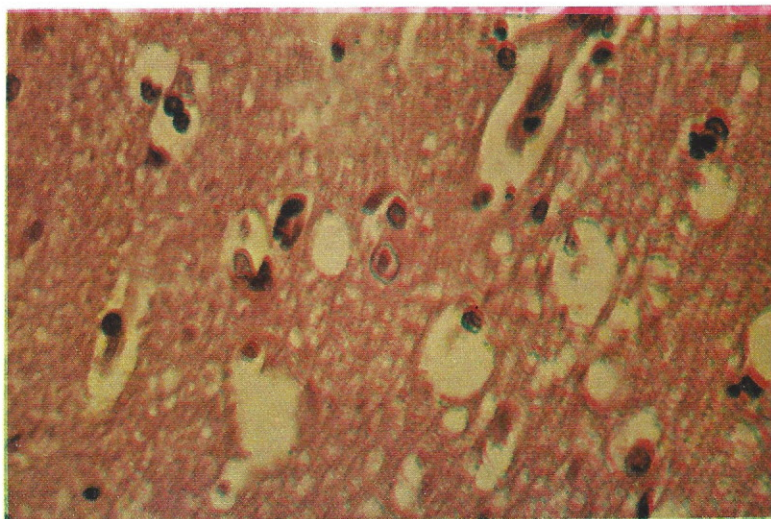


FIGURA 2 — Presença de inclusão intranuclear característica.

As amostras de líquor e encéfalo foram imediatamente congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento de serem processadas e, da amostra de sangue, o soro resultante foi congelado a  $-15^{\circ}\text{C}$  até o momento dos exames.

Para as tentativas de isolamento de vírus do encéfalo, parte deste material foi triturado, tratado com antibióticos, controlado bacteriológicamente e inoculado em sistemas celulares contínuos denominados SIRC, células de córnea de coelho, e VERO, células de rim de macaco. Soro e líquor também foram inoculados independentemente nestes dois sistemas celulares, sem qualquer diluição, após controle bacteriológico.

Foram realizadas provas de neutralização em culturas celulares pelo método da microtécnica<sup>13</sup> nas amostras de líquor e soro, visando a demonstrar anticorpos neutralizantes específicos para herpes simples. Nestas provas, empregaram-se 100 DICT<sub>80</sub> do vírus padrão de *Herpesvirus hominis* (HVH), tipo 1, cepa Mc Intyre. O título do soro ou líquor foi tomado como a recíproca da mais alta diluição que inibiu o crescimento do vírus em 50% ou mais (CPE). Foram incluídos, além dos controles das células, controles de 100, 10 e 1 DICT<sub>80</sub> do vírus padrão.

As provas de fixação do complemento nas amostras de soro e líquor foram realizadas pela microtécnica preconizada pelo Laboratory Branch Complement Fixation, Center of Diseases Control, Atlanta, Ga., EUA.

As provas para identificação do tipo de vírus do herpes simples isolado foram: tamanho das lesões produzidas nas membranas corialantóides de ovos embrionados de galinha; inibição parcial ou total do crescimento do vírus em culturas primárias de células de embrião de galinha (EG); prova de neutralização em culturas celulares<sup>13</sup> em microplacas, usando soros imunes monovalentes anti-HVH, tipos 1 e 2.

## RESULTADOS

### Exame anatomopatológico

O exame histológico mostra fragmentos de encéfalo, representando camada cortical, observando-se leptomeninges com vasos intensamente dilatados e congestos, reação periférica inflamatória constituída predominantemente por linfócitos. A camada cortical mostra freqüentes necroses de neurônios, além de intensa reação glial. Nas áreas subcorticais, observam-se espongiose, áreas focais de necrose com infiltrado de células gliais e raros neutrófilos, vasos dilatados e congestos, alguns com parede necrótica, pequenos focos de hemorragia. As células astrocitárias mostram-se reativas, notando-se em alguns núcleos cromatina condensada na periferia da membrana nuclear, evidenciando-se presença de inclusão intranuclear de coloração eosino-

fílica. A mesma inclusão também é vista em células oligodendrogliais, porém em menor freqüência.

Foi diagnosticada encefalite virótica (ver fig. 1 e 2).

### Estudo virológico

As inoculações de fragmentos de encéfalo em sistemas celulares SIRC e VERO foram positivas, isto é, no terceiro dia de incubação foram vistas lesões ou focos de efeito citopático que evoluíram para 4 + (plus) de efeito citopático nos dias subseqüentes.

As inoculações da amostra de líquor nos mesmos sistemas celulares não apresentaram, após 7 ou 8 dias de incubação e observação, qualquer efeito visível, razão pela qual procedemos a três passagens seriadas que também resultaram negativas.

As amostras de vírus isoladas do encéfalo e sangue foram submetidas a duas passagens seriadas independentes e tituladas em sistema celular VERO. Sua identificação resultou em neutralização de 100 DICT<sub>80</sub> dos vírus isolados pelo soro-imune específico anti HVH tipo 1 obtido de coelhos hiperimunizados. Desta maneira, os vírus isolados foram independentemente identificados como *Herpesvirus hominis*.

As provas de identificação do tipo de HVH isolado resultaram em lesões com tamanho característico, dentro dos padrões apresentadas pelos HVH tipo 1 nas inoculações em membranas corialantóides de ovos embrionados de galinha. O vírus isolado, passado em sistema celular primário de embrião de galinha, resultou em inibição do crescimento, enquanto que em outro sistema celular controle susceptível (VERO) houve desenvolvimento do vírus, manifestado por intenso efeito citopático. As provas de neutralização em sistema celular SIRC para identificação do tipo de vírus isolado, usando soros imunes anti-herpes simples tipos 1 ou 2 monovalentes, resultaram em maior inibição do crescimento para o vírus homólogo, isto é, HVH, tipo 1.

As reações de neutralização em culturas celulares e de fixação do complemento para demonstrar a presença de anticorpos específicos para herpes simples resultaram em:

sangue	neutralização: negativa (menor que 1:4)
	fixação de complemento: negativa
líquor	neutralização: título = 1:32
	fixação de complemento: título 1:4

Em vista destes resultados, resolvemos realizar também a titulação de anticorpos para sarampo na amostra de LCR. Esta titulação resultou *negativa* na menor diluição usada, isto é, 1:4.

Quaisquer títulos encontrados nestas provas significam presença de anticorpos específicos para a infecção. A ausência de anticorpos na menor diluição usada na prova de neutralização significa ausência de anticorpos na amostra ou a presença em títulos não detectáveis pela sensibilidade da prova. Por outro lado, os títulos encontrados no líquido atestam a presença destes anticorpos neste material.

É interessante ressaltar nestes resultados que, embora os materiais para exame virológico tenham sido colhidos no mesmo dia (12-6-80), por um médico, é bom esclarecer que os instrumentais usados para as colheitas foram diversos. Isto, é necessário frisar, porque haveria a possibilidade de supormos que o isolamento de vírus do encéfalo fosse, na realidade, possível contaminação sanguínea, pois que o material, aspirado com seringa do encéfalo através da falha óssea, veio acompanhado de pequena quantidade de sangue. Ora, como o vírus também foi isolado do sangue circulante, poderíamos supor que o vírus isolado do encéfalo fosse devido a contaminação sanguínea. No entretanto, esta hipótese pode ser facilmente afastada pelo simples fato de existir o suporte histopatológico da presença de conjunto de alterações de encefalite, inclusive com inclusões intranucleares viróticas. Em outras palavras existem no caso em foco lesões causadas por vírus no tecido nervoso.

## COMENTÁRIOS

Todos os autores afirmam que os sintomas e sinais apresentados pela encefalite herpética são similares aos apresentados pelas outras encefalites de etiologia virótica, tornando o diagnóstico etiológico de certeza da infecção extremamente difícil em vida, a não ser que determinados exames complementares sejam feitos. Neste sentido é bom lembrar que, diferentemente de outras infecções causadas por vírus, a resposta humoral sanguínea durante a infecção herpética, ainda que resulte em aumento significativo de títulos em duas amostras, sendo a primeira colhida na fase inicial da infecção e a segunda, se possível, com cerca de duas semanas de intervalo após a primeira, não representa diagnóstico de certeza mas, simplesmente, diagnóstico especulativo ou mesmo presuntivo da infecção<sup>15, 17</sup>. A simples presença de anticorpos, seja no sangue como no líquido, não fornece diagnóstico etiológico definitivo<sup>15</sup>; somente o aumento significativo de título para herpes simples no LCR, demonstrado através das técnicas de neutralização em sistemas celulares, neutralização complemento-dependente, fixação do complemento, hemaglutinação indireta e inibição da hemaglutinação e imunofluorescência, é que permite o diagnóstico definitivo da etiologia em causa, quando da ausência do isolamento do vírus. No entanto, existe a possibilidade de, nestas provas, estarmos frente a aumento de título

devido a outro vírus do mesmo gênero, como por exemplo, o *Herpesvirus varicellae* (vírus V-Z), que dá reações cruzadas com o herpes simples<sup>24</sup>.

Obviamente, sem o isolamento e a identificação do agente causal do cérebro ou a demonstração de produtos do vírus, isto é, antígeno virótico no cérebro e dificilmente no líquido, os casos presuntivos continuarão a ser considerados como "possíveis", independentemente da história pregressa de recorrência nos lábios ou em qualquer outro local.

A demonstração da partícula virótica, através da microscopia eletrônica em materiais colhidos em vida por punção, biópsia ou ato cirúrgico, permite o diagnóstico de encefalite por vírus, limitando-o, porém, ao grupo ou gênero do agente. Por exemplo, a morfologia e o tamanho das partículas não diferencia o vírus do herpes simples dos outros do mesmo gênero, tais como varicela-zoster, citomegalovírus e vírus de Epstein-Barr.

O não isolamento de vírus do líquido ou do cérebro, somados aos dados negativos da pesquisa de antígenos viróticos nestes materiais, não exclui o diagnóstico de encefalite causada por vírus frente ao quadro histopatológico conclusivo, principalmente quando nele é constatada a presença de corpúsculos de inclusão típicos, seja intranuclear ou intracitoplasmáticos. Porém, este quadro histopatológico é comum a outras encefalites a vírus, como as devidas aos vírus do sarampo, influenza, caxumba, coriomeningite linfocitária, citomegalovírus, arbovírus e enterovírus.

Na realidade, somente as encefalites devidas à raiva (corpúsculo de Negri) e ao citomegalovírus permitem diagnóstico de certeza do vírus em causa, a partir do encontro destas inclusões.

Há divergência quanto ao diagnóstico afirmativo pelas inclusões quando elas são devidas ao vírus do sarampo na panencefalite subaguda esclerosante.

Sob o ponto de vista da afirmação do diagnóstico, é interessante o fato de que raramente se consegue, em encefalite herpética, o isolamento do vírus a partir do líquido, sendo este material considerado pelos autores<sup>20</sup> como meio pobre, sem grandes possibilidades para isolamento de vírus, em contraste com os melhores resultados obtidos através de biópsia ou autópsia cerebral. Em nosso caso, também não conseguimos o isolamento do vírus a partir do líquido, ainda que tenhamos usado dois sistemas celulares bastante sensíveis ao desenvolvimento do vírus do herpes simples. Alguns autores chamam a atenção para a falha do isolamento a partir do líquido como um fato inexplicável<sup>20</sup>. Acharmos que, provavelmente, o não isolamento do vírus do líquido poderia ser dependente da presença dos anticorpos específicos demonstráveis pelos métodos usuais ou, ainda, pela presença de anticorpos em níveis baixos não demonstráveis pela sensibili-

dade dos métodos usuais. A possibilidade de formação de imunocomplexo deve ser considerada, impedindo, desta maneira, o isolamento do vírus.

Raciocinando com estes dados, encontramos uma possível explicação para o fato de termos obtido o isolamento do vírus a partir do sangue, e não do líquor. Na presença da viremia, não encontramos anticorpos e, na presença dos anticorpos, não isolamos o vírus do líquor.

Aliás, mais uma vez, ficou provado que as células linfóides do sistema nervoso central formam seus próprios anticorpos específicos, isto é, há síntese local de imunoglobulinas<sup>3, 5, 6</sup>. Ficou bem evidenciado, em nosso caso, que os anticorpos no líquor não poderiam ser interpretados como provenientes do sangue circulante através de lesão na barreira hemoliquórica, pelo simples fato de que não foram detectados estes anticorpos no sangue circulante. Por esta razão, não seria preciso fazer qualquer comparação com titulações diversas de outros anticorpos no sangue e no líquor para verificação da integridade da barreira hemoliquórica, nem o estudo das imunoglobulinas no LCR e da relação albumina no líquor e sangue, conjugada aos anticorpos nestes materiais<sup>11</sup>. No entanto, foi realizada prova de neutralização para detectar anticorpos para sarampo no LCR, com resultados negativos. Ainda mais, já foi descrita reação imunitária presente no líquor na esclerose múltipla, leucoencefalite subaguda e neuro-sífilis<sup>7</sup>, e encefalite herpética<sup>14</sup>, sem qualquer lesão da barreira hemoliquórica<sup>15</sup>.

Outros fatos de importância para o caso descrito são os trabalhos de UDZOZO *et alii*<sup>25</sup> que demonstraram a presença isolada de anticorpos IgM no líquor em níveis mais altos do que no sangue, em casos de linfoma de Burkitt, vírus Epstein-Barr, *Herpesvirus*, e os de RUSSEL & SAERTRE<sup>22</sup>, em 1976, que asseveraram o encontro de anticorpos para HVH no LCR de vinte pacientes "normais", correspondendo a 66% do total examinado, através de técnica sensível de titulações de anticorpos, qual seja, os mediados pela célula dependente da imunólise. Estes pacientes "normais" contavam em sua história progressiva ataques labiais recorrentes de herpes simples e, conseqüentemente, todos possuíam anticorpos para herpes simples no sangue circulante. Ora, segundo os achados deste último autor, poderíamos inferir que, através de procedimentos sensíveis, a presença de anticorpos para *Herpesvirus hominis* no LCR não tem maior significado diagnóstico de infecção atual. Por outro lado, tal achado faz supor a possibilidade de que as encefalites herpéticas sejam extremamente comuns e que, na sua grande maioria, incidem sob a forma subclínica ou inaparente, tendo em vista o fato de que o indivíduo normal não apresenta qualquer lesão da barreira hemoliquórica.

Importante também é a suposição de FRIDEN *et alii*<sup>6</sup>, baseados em experimentos em animais, de que o dano causado ao tecido cerebral

seria resultante de reação imunocelular contra as células infectadas pelo vírus e não ação direta do próprio vírus. Por esta razão, a maioria dos autores insistem em que o tratamento com esteróides, em vez de ser contra-indicado, deve ser ministrado em altas doses, tendo em vista limitar a reação imunológica de destruição, diminuir o edema celular e a hipertensão intracraniana.

Outro ponto de interesse a ser discutido seria a via de acesso do vírus ao sistema nervoso central (SNC). Neste particular, sabemos que a via de invasão ainda não está bem esclarecida. No entanto, existem evidências experimentais e clínicas de que o vírus pode invadir, por via centripeta, isto é, através dos nervos, onde a infecção segue pelas células de Schwann e fibroblastos, e não através dos axônios. Tal fato é documentado por estudo através da imunofluorescência<sup>10</sup>.

Complementando, a via de invasão do SNC se dá hipoteticamente pela passagem do vírus do trato olfatório, através da placa cribiforme ou através dos gânglios nervosos<sup>10</sup>. Neste sentido, os trabalhos de BARINGER<sup>2</sup> e de WARREN *et alii*<sup>27</sup> sobre a latência do vírus no gânglio de Gasser e cervicais são dados de inquestionável contribuição.

Por outro lado, também a invasão através do sangue circulante foi comprovada em animais. Sob o ponto de vista clínico, a invasão pode ser resultante de uma infecção generalizada, mais encontrada em recém-nascidos nos quais o vírus pode ser isolado do sistema nervoso, assim como de vários outros órgãos. Jovens e adultos raramente apresentam sintomas de meningoencefalite durante a vigência de herpes simples primário da pele ou mucosas.

A infecção primária do SNC também é possível sem sintomas ou sinais de infecção pelo vírus do herpes simples em qualquer local do organismo. Neste particular, é de importância salientar que a paciente nada apresentava sob o ponto de vista clínico na pele e/ou nas mucosas e não contava qualquer episódio de recorrência pelo vírus do herpes simples.

Segundo os dados disponíveis, o presente caso foi resultante de uma infecção primária do SNC por *Herpesvirus hominis*, tipo 1. Aliás, com raras exceções, a encefalite é quase sempre causada pelo HVH, tipo 1.

Assim sendo, teríamos que admitir sob o ponto de vista epidemiológico que a paciente em causa pertencia à faixa dos 10% das pessoas normais que escaparam da infecção herpética primária clínica ou subclínica durante o decorrer da vida; este fato é consubstanciado pela ausência de anticorpos para HVH no sangue. Em inquérito sorológico realizado por nós em 1980 em nosso meio<sup>23</sup>, verificamos que, no grupo etário de 35 a 39 anos, 90% das amostras apresentavam anticorpos para herpes simples; isto é, tinham tido experiência anterior com a infecção em qualquer época no passado.



A introdução de medicações antiviróticas específicas como o IDU (5 iodo 2'-deoxyuridina)<sup>18</sup>, cujos resultados em estudos bem controlados com altas doses desta droga<sup>4</sup> resultaram em falha no tratamento da encefalite herpética, orientaram, posteriormente, vários autores no uso experimental dos arabinosídeos, principalmente o Ara-A (vidarabina). As experiências com este produto resultaram na redução de índices de mortalidade de 70 para 28%<sup>28</sup>. No entanto, HAMMER *et alii*<sup>8</sup> relatam que, usando este mesmo produto na dose de 15 mg/kg, diariamente, por dez dias consecutivos, a mortalidade após um mês resultou em 50% dos casos e que, em seguimento mais

prolongado, este índice subiu para 75% de mortalidade.

Resulta, pois, que a precocidade do diagnóstico da encefalite herpética tem a finalidade dupla:

a) tentativa de tratamento com drogas antiviróticas que, quanto mais precocemente administradas, enfeixam maiores possibilidades de sucesso, isto naturalmente, quando elas estão ao nosso alcance, e a despeito da alta percentagem de insucessos;

b) tratamento da hipertensão intracraniana através de procedimento cirúrgico, que ainda é de importância capital no tratamento deste tipo de encefalite.

RIALA6/542

SALLES GOMES, L.F.; SALLES GOMES JR., C.E.; SEMENTILLI, A.; SAKUMA, M.E. & CAMARGO, E.D. — Herpetic encephalitis: report of a case due to *Herpesvirus hominis*, type 1. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):27-34, 1982.

ABSTRACT: A clinical and etiological study of a case of herpetic encephalitis is presented. A brain biopsy was made during a temporal lobotomy aimed at intracranial decompression. Microscopic examination of sections of the right temporal lobe of the brain disclosed a viral encephalitis with intranuclear inclusion bodies in astrocytes. *Herpesvirus hominis* type 1 was isolated and identified from the brain tissue and from the blood. Specific antibodies were found in the spinal fluid but not in the blood.

DESCRIPTORS: encephalitis, herpetic; *Herpesvirus hominis* type 1, isolation from brain and blood; viral encephalitis, histologic diagnosis.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, J. & JENNET, W.B. — Acute necrotizing encephalitis: a problem in diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 30:248-54, 1967.
2. BARINGER, J.R. & SWOVELAND, P. — Recovery of herpes simplex virus from human trigeminal ganglions. *New Engl. J. Med.*, 288:648-50, 1973.
3. COHEN, S. & BANNISTER, R. — Immunoglobulin synthesis within central nervous system in disseminated sclerosis. *Lancet*, 1:366-7, 1967.
4. FAILURE of high dose 5-iodo-2'-deoxyuridine in the therapy of herpes simplex virus encephalitis; evidence of unacceptable toxicity. *New Engl. J. Med.*, 292:599-603, 1975.
5. FRYDÉN, A. & LINK, H. — Mitogen stimulation of cerebrospinal fluid lymphocytes in aseptic meningitis. *Acta Neurol. scand.*, 57:8-18, 1978.
6. FRYDÉN, A.; LINK, H. & MÜLLER, E. — Demonstration of cerebrospinal fluid lymphocytes sensitized against virus antigen in mumps meningitis. *Acta Neurol. scand.*, 57:396-404, 1978.
7. GLASNER, H. — Barrier impairment and immune reaction in the cerebrospinal fluid. *Eur. Neurol.*, 13:304-14, 1975.
8. HAMMER, S.M.; BUCHMAN, T.G.; D'ANGELO, L.J.; KARCHMER, A.W.; ROIZMAN, B. & HIRSCH, M.S. — Temporal cluster of herpes simplex encephalitis: investigation by restriction endonuclease cleavage of viral DNA. *J. infect. Dis.*, 141:436-40, 1980.
9. HAYMAKER, W.; SMITH, M.G.; VAN BOGAERT, L. & CHENAR, C. — Viral encephalitis. In: SIMPOSIUM ON VIRAL ENCEPHALITIS; compiled and edited by William S. Fields & Russel J. Battner. Springfield, Ill., Charles C. Thomas, c1958. p. 95.

SALLES GOMES, L.F.; SALLES GOMES JR., C.E.; SEMENTILLI, A.; SAKUMA, M.E. & CARMARGO, E.D. — Encefalite herpética: apresentação de um caso devido a *Herpesvirus hominis* tipo 1. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):27-34, 1982.

10. JOHNSON, R.T. — The pathogenesis of herpesvirus encephalitis. I. Virus pathways to the nervous system of suckling mice demonstrated by fluorescent antibody staining. *J. exp. Med.*, 119:343-56, 1964.
11. KLAPPER, P.E.; LAING, I. & LONGSON, M. — Rapid non-invasive diagnosis of herpes encephalitis. *Lancet*, 2:607-8, 1981.
12. LEIDER, W.; MAGOFFIN, R.L.; LENNETTE, E.H. & LEONARDS, L.N.R. — Herpes simplex virus encephalitis: its possible association with reactivated latent infection. *New Eng. J. Med.*, 273:341, 1965.
13. LENNETTE, E.H. & SCHMIDT, N.J. — Diagnostic procedures for viral, rickettsial and Chlamydial infections. Washington, D.C., APHA, c1979. p. 332-5.
14. LERNER, A.M.; LANTER, C.B.; NOLAN, D.C. & SHIPPEG, M.J. — Passive hemagglutinating antibodies in cerebrospinal in *Herpesvirus hominis* encephalitis. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 140:1460-6, 1972.
15. LERNER, A.M.; WILSON, F.M.; LANTER, C.B.; CUSHING, R.D.; REYES, M.P.; NOLAN, D.C. & LEGASPI, R.C. — An estimate of the course of herpes simplex virus encephalitis. *Scand. J. infect. Dis.*, 8:37-44, 1976.
16. LORD, R.A.; GOLDBLUM, R.M.; FORMAN, P.M.; DUPREE, E.; STOREY, W.D. & GOLDMAN, A.S. — Cerebrospinal-fluid IgM in the absence of serum-IgM in combined immunodeficiency. *Lancet*, 2:528-9, 1973.
17. MACCALLUM, F.O.; CHINN, F.J. & GOSTLING, J.V.T. — Antibodies to herpes-simplex virus in the cerebrospinal fluid of patients with herpetic encephalitis. *J. med. Microbiol.*, 7:325-31, 1973.
18. MARSHALL, W.J.S. — Herpes simplex encephalitis treated with idoxuridine and external decompression. *Lancet*, 2:579-80, 1967.
19. MEYER, H.M., Jr.; JOHNSON, R.T. & CRAWFORD, I.P. — Central nervous system syndromes of viral etiology: a study of 773 cases. *Amer. J. Med.*, 29: 334-47, 1960.
20. MILLER, J.K.; HESSER, F. & TOMPKINS, V.N. — Herpes simplex encephalitis — Report of 20 cases. *Ann. intern. Med.*, 64:92-103, 1966.
21. NOLAN, D.C.; CARRUTHERS, M.M. & LERNER, A.M. — *Herpesvirus hominis* encephalitis in Michigan. — Report of thirteen cases, including six treated with idoxuridine. *New Engl. J. Med.*, 282:10-3, 1970.
22. RUSSEL, A.S. & SAERTRE, A. — Antibodies to herpes-simplex virus in "normal" cerebrospinal fluid. *Lancet*, 1:64-5, 1976.
23. SALLES GOMES, L.F.; SAKUMA, M.E. & CURTI, S.P. — *Herpesvirus hominis*: estado atual da frequência dos anticorpos em habitantes da cidade de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2): 107-114, 1981.
24. SCHMIDT, N.J.; LENNETTE, E.H. & MAGOFFIN, R.L. — Immunological relationship between herpes simplex and varicella-zoster demonstrated by complement-fixation, neutralization and fluorescent antibody tests. *J. gen. Virol.*, 4:321-8, 1969.
25. UDEOZO, I.O.K.; BEZER, A.E.; OSUNKOIA, B.O.; NGU, V.A.; LUZZATTO, L. & McFARLANE, H. — Cerebrospinal fluid immunoglobulins in Burkitt lymphoma. *J. Lab. clin. Med.*, 71:912-8, 1968.
26. VAN BOGAERT, L.; RADERMECKER, J. & DEVOR, J. — Sur une observation mortelle d'encephalite aigue nécrósante. *Rev. Neurol. (Paris)*, 92:329-55, 1955.
27. WARREN, K.G.; BROWN, S.M.; WROBLEWSKA, Z.; GILDEN, D.; KOPROWSKI, E. & SUBAK-SHARP, J. — Isolation of latent herpes simplex virus from the superior cervical and vagus ganglions of human beings. *New Engl. J. Med.*, 298:1068-9, 1978.
28. WHITLEY, R.J.; SOONG, S.J.; ROLIN, R.; GALASSO, G.J.; CH'EN, L.T.; ALFORD, C.A. *et alii* — Adenine arabinoside therapy of biopsy-proved herpes simplex encephalitis. *New Engl. J. Med.*, 297: 289-94, 1977.

Recebido para publicação em 20 de outubro de 1981.

## NÍVEIS DE CHUMBO EM ALIMENTOS INFANTIS \*

Walkyria H. LARA \*\*  
Alice Momoyo SAKUMA \*\*  
Helena Yuco YABIKU \*\*

RIALA6/548

LARA, W.H.; SAKUMA, A.M.A. & YABIKU, H.Y. — Níveis de chumbo em alimentos infantis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):35-38, 1982.

**RESUMO:** Setenta e uma amostras de alimentos infantis encontrados à venda nos supermercados da cidade de São Paulo, SP, provenientes das duas firmas que industrializam esses produtos no Brasil, correspondendo aos diferentes tipos de alimentos por elas fabricados, como sucos, cremes, frutas em conserva, pudins, sopas, etc., foram analisadas para determinação dos níveis de chumbo pelo método de espectrofotometria de absorção atômica. Os níveis encontrados apresentaram um mínimo de 0,02 mg/kg e um máximo de 0,37 mg/kg, com mediana de 0,11 mg/kg e 90.<sup>o</sup> percentil de 0,20 mg/kg. Todos os valores encontrados estão dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira para esses alimentos.

**DESCRIPTORIOS:** alimentos, análise; alimentos infantis, determinação de chumbo; chumbo em alimentos infantis; espectrofotometria de absorção atômica.

### INTRODUÇÃO

O chumbo é um metal cuja tecnologia para sua obtenção e cujo uso são conhecidos desde os tempos em que os romanos o aplicavam nos seus aquedutos, vasilhames de cozinha e nos recipientes para fazer vinhos<sup>13</sup>.

A ação tóxica desse elemento no organismo humano é descrita desde há muito tempo e, na sua forma mais conhecida, o "saturnismo", é caracterizada por convulsões, coma, ataxia, vômitos persistentes e hiperirritabilidade<sup>11</sup>.

Devido à exposição ambiental, os alimentos podem ser uma fonte de introdução de baixos níveis de chumbo no organismo e, embora a absorção seja pequena, este vai-se acumulando no organismo durante a vida toda<sup>9</sup>.

O chumbo normalmente encontrado nos alimentos, cujos níveis variam de 0,1 a 0,5 mg/kg, provém da própria contaminação do ar, do solo ou da água, dos produtos agrícolas, ou é adquirido durante o processamento dos alimentos ou nos recipientes em que os mesmos se envasam, tais como, latas com solda,

cerâmica com tintas ou vernizes à base de sais de chumbo<sup>10</sup>.

Há evidência de que as crianças absorvem, mais do que os adultos, o chumbo ingerido através dos alimentos<sup>7</sup>; daí, o grande interesse em se conhecerem quais os níveis nos mesmos pois, apesar de recente no Brasil, o uso de alimentos infantis industrializados tende a aumentar por várias razões de ordem social e econômica.

Para conhecimento dos níveis de chumbo nesses alimentos foram analisadas 71 amostras de produtos encontrados à venda nos supermercados da cidade de São Paulo, provenientes das duas firmas que industrializam esses produtos no Brasil, correspondendo a vários tipos, tais como, sucos, cremes, pudins, sopas etc.

### MATERIAL

Foram analisadas 71 amostras de alimentos infantis envasados em vidros, encontrados à venda nos supermercados da cidade de São Paulo.

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

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

## MÉTODO

Foi utilizado o método de determinação de chumbo por espectrofotometria de absorção atômica, com chama.

### Equipamento

Espectrofotômetro de absorção atômica, equipado com queimadores de fenda única para ar e acetileno.

Condições instrumentais — comprimento de onda: 283,3 nm; fenda: 0,7 nm; fonte: lâmpada de descarga de chumbo.

### Reagentes

Solução de ácido clorídrico 6 N:

Ácido clorídrico p.a. suprapur . . . . 50 ml  
Água desmineralizada até completar 100 ml  
Soluções padrões de chumbo:

Solução I (1.000 µg/ml) — Dissolver 1,598 g de nitrato de chumbo em ácido nítrico a 1% (v/v), e completar o volume a 1 litro com o mesmo ácido.

Solução 0,5 e 1,0 µg/ml — Pipetar 2 ml da solução I em balão volumétrico de 200 ml e completar o volume com água desmineralizada. A partir desta solução, pipetar alíquotas de 5 e 10 ml, em balões volumétricos de 100 ml, e completar o volume com água desmineralizada.

Metil isobutil cetona

### Procedimento

Pesar com exatidão, em cápsula de sílica, cerca de 10 g da amostra previamente homogeneizada. Aquecer em banho-maria até secagem. Queimar a amostra seca em bico de Bünsen, iniciando a queima com chama baixa, aumentando aos poucos com cuidado para não aquecer demais. Incinerar em mufla a 350°C, por três horas. Dependendo do produto, se as cinzas não ficarem brancas, é necessário retirar a cápsula da mufla, esfriar e adicionar gotas de solução de nitrato de magnésio a 50% (p/v). Evaporar em banho-maria, secar e voltar à mufla por mais três horas. Repetir o processo, se necessário.

Dissolver as cinzas obtidas com 2 ml de água e mais 5 ml de solução de ácido clorídrico 6 N. Aquecer para uma dissolução completa. Transferir a solução para um balão volumétrico de 100 ml. Adicionar 5 ml da solução de pirrolidina ditiocarbamato de amônio. Agitar vigorosamente por dois minutos. Colocar água desmineralizada saturada com metil isobutil cetona até que a fase orgânica atinja o topo do balão. Fazer a leitura no espectrofotômetro, aspirando diretamente a fase orgânica.

Fazer a leitura do branco de uma solução constituída de 5 ml de ácido clorídrico 6 N,

algumas gotas da solução de nitrato de magnésio a 50%, complexada e extraída da mesma maneira como para a amostra.

Realizar a curva de calibração com soluções padrões contendo 0,5 e 1,0 µg/ml de chumbo, acidificadas com 5 ml de ácido clorídrico 6 N, complexadas com 5 ml de solução de pirrolidina ditiocarbamato de amônio e extrair o complexo formado com 5 ml de metil isobutil cetona.

## RESULTADOS

Os resultados da análise das amostras encontram-se relacionados na tabela da página seguinte.

## DISCUSSÃO

Todas as amostras analisadas apresentaram níveis de chumbo, com um valor máximo de 0,37 mg/kg e um mínimo de 0,02 mg/kg. O valor da mediana está situado em 0,11 mg/kg e o 90.º percentil \*, em 0,20 mg/kg. Esses valores não estão acima dos normalmente encontrados nas frutas, vegetais e cereais *in natura*, se forem comparados aos obtidos num Programa Conjunto FAO/OMS de Monitoramento e Contaminação de Alimentos e Rações <sup>3</sup>.

Quando os alimentos são processados e envasados em latas com soldas, muitas vezes os níveis de chumbo são altos <sup>12</sup>. O fato de serem os alimentos infantis no Brasil envasados em vidros constitui uma boa medida para evitar essa contaminação.

Em nenhuma das amostras o nível atingiu o valor de 8 mg/kg, que é o limite máximo admitido pela legislação vigente no Brasil para alimentos em geral <sup>1</sup>. Essa legislação deve ser revista face às recomendações da "Codex Alimentarius Commission" <sup>5</sup>, que estabelece limites para néctar de fruta, 0,3 mg/kg, cacau em pó e mistura de açúcar e cacau, 2 mg/kg, caseína ácida comestível, 2 mg/kg, caseinatos comestíveis, 2 mg/kg e face às resoluções específicas da Câmara Técnica de Alimentos do Ministério da Saúde <sup>2,3,4</sup>, que estabelece para geléias de frutas, 0,5 mg/kg, frutas em conserva, 0,5 mg/kg e coco ralado, 0,5 mg/kg.

Segundo monografia da "International Agency for Research on Cancer", o nível máximo tolerado pelo "Codex Alimentarius Commission" é de 0,3 mg/kg para frutas e vegetais enlatados <sup>6</sup>. Este limite estabelecido, em relação à ingestão semanal aceitável para adultos, é de 0,05 mg/kg de peso corpóreo. Convém, entretanto, lembrar que o valor do 90.º percentil por nós encontrado situa-se dentro desse valor tolerado e que, até o momento, não há um limite para a ingestão semanal aceitável estabelecido para crianças de baixa idade. Daí, a importância de que os alimentos infantis apresentem o mínimo possível de níveis de chumbo.

\* Valor abaixo do qual 90% das amostras estão distribuídas na relação do número de amostras e valores encontrados na tabela.

TABELA  
Níveis de chumbo em alimentos infantis em conserva

Amostra n.º	Produto	Chumbo mg/kg (ppm)
1	Suco de laranja	0,12
2	Suco de laranja e abacaxi	0,17
3	Suco de frutas diversas	0,03
4	Creme de maçã	0,14
5	Creme de frutas e verduras	0,22
6	Creme de legumes e verduras	0,10
7	Creme de espinafre	0,07
8	Creme de espinafre	0,08
9	Creme de espinafre	0,05
10	Creme de espinafre	0,09
11	Creme de espinafre	0,05
12	Creme com batata e mandioquinha	0,02
13	Purê de pera	0,08
14	Purê de damasco	0,07
15	Purê de damasco	0,19
16	Purê de pêssego	0,26
17	Purê de banana	0,11
18	Pudim de arroz doce	0,12
19	Pudim de laranja	0,14
20	Pudim de arroz doce	0,17
21	Frutas diversas	0,10
22	Frutas sortidas	0,10
23	Maçã	0,06
24	Goiaba	0,02
25	Banana	0,10
26	Ameixa	0,15
27	Pêssego	0,13
28	Damasco	0,10
29	Goiabas	0,17
30	Banana com abacaxi	0,04
31	Banana e abacaxi	0,05
32	Maçã e laranja	0,26
33	Mamão e maçã	0,18
34	Cenoura e laranja	0,11
35	Legumes diversos	0,10
36	Legumes variados	0,12
37	Legumes com carne	0,14
38	Legumes com figado	0,08
39	Legumes com frango	0,03
40	Legumes com figado e arroz	0,05
41	Galinha com legumes e arroz	0,10
42	Galinha com legumes	0,04
43	Galinha com creme de batata	0,12
44	Galinha com arroz e cenoura	0,03
45	Galinha com batata e cenoura	0,30
46	Galinha com arroz	0,08
47	Galinha com arroz e cenoura	0,13
48	Galinha com batata e cenoura	0,13
49	Frango com cenoura e batata	0,02
50	Frango com arroz e ovos	0,05
51	Frango com macarrão	0,11
52	Frango com legumes e cereais	0,11
53	Frango com arroz e legumes	0,13
54	Frango com legumes e macarrão	0,12
55	Frango com arroz e gemas de ovos	0,02
56	Frango com arroz e legumes	0,12
57	Frango com creme de legumes	0,11
58	Frango com creme de legumes	0,22
59	Carne com macarrão	0,37
60	Carne com macarrão e legumes	0,09
61	Carne com legumes e arroz	0,03
62	Carne com batata e mandioquinha	0,02
63	Carne com arroz e cenoura	0,17
64	Carne com batata e cenoura	0,14
65	Carne com legumes	0,10
66	Carne com macarrão	0,12
67	Fígado com legumes	0,17
68	Cenoura	0,08
69	Cenoura com arroz	0,12
70	Macarrão e tomate com arroz	0,09
71	Canjinha	0,11

RIALA6/543

LARA, W.H.; SAKUMA, A. M. & YABIKU, H.Y. — Lead levels in baby foods sold in São Paulo City, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):35-38, 1982.

ABSTRACT: 71 samples of baby foods such as juices, creams, fruits, puddings and soups produced by the two industries which process baby foods in Brazil, sold at groceries of the city of São Paulo, were analysed for their lead content by atomic-absorption spectrophotometry. The levels observed fall in the range from 0.02 mg/kg to 0.37 mg/kg with a median of 0.11 mg/kg and the 90<sup>th</sup> percentile of 0.20 mg/kg. All them had levels acceptable according to Brazilian law for these foods.

DESCRIPTORS: baby foods, lead determination; foods, analysis; lead in baby foods, determination by atomic-absorption spectrophotometry.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Decreto n.º 55.871 de 26 mar. 1965. *Diário Oficial*, Brasília, 9 abr. 1965. Seç. 1, pt. 1, p. 3611. Modifica o Decreto n.º 50.040 de 24 jan. 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto n.º 691 de 13 mar. 1962.
2. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução normativa n.º 05/79 da Câmara Técnica de Alimentos do Conselho Nacional de Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 8 ot. 1979. Seç. 1, pt. 1, p. 14755. Fixa a identidade e as características mínimas de qualidade para frutas e conservas.
3. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução normativa n.º 12/79 da Câmara Técnica de Alimentos do Conselho Nacional de Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 1.º maio 1979. Seç. 1, pt. 1, p. 7547. Fixa a identidade e as características mínimas de qualidade para o coco ralado.
4. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução normativa n.º 15/78 da Câmara Técnica de Alimentos do Conselho Nacional de Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 1.º mar. 1979. Seç. 1, pt. 1, p. 2929. Fixa a identidade e as características mínimas de qualidade para geléias de frutas.
5. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. *List of maximum levels recommended for contaminants by the FAO/WHO Codex Alimentarius Commission*. 3th series. Rome, FAO/WHO, 1978. p. 6. (CAC/FAO 4-1978)
6. IARC working group on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Lyon, 1979. *Some metals and metallic compounds*. Lyon, IARC, 1980. p. 42. (IARC monographs, 23)
7. JOINT FAO/WHO food and animal feed contamination monitoring programme, phase II. *Guidelines for establishing or strengthening national food contamination monitoring programmes*. Geneva, WHO, 1979. p. (FAO Food Control Ser. n. 5 WHO/HCS/FCM/78.1)
8. JOINT FAO/WHO food and animal feed contamination monitoring programme, phase II. *Summary report of data received from collaborating centres for food contamination monitoring*. Stage I — 1977. Geneva, WHO 1979. p. 45-6. (FAO: ESN/MON/82.2; WHO:HCS/FCM/82.2)
9. KOLBYE, JR., A.C.; NAHAFFEY, K.R.; FIORINO, J.A.; CORNELIUSSEN, P.C. & JELINEX, C.F. — Food exposures to lead. *Environ. Health Perspect.*, 7:65-74, 1974.
10. ROSCHNIK, R.K. — The determination of lead in foods by atomic-absorption spectrophotometry. *Analyst*, 98:596-604, 1973.
11. RUMMO, J.H.; ROUTH, D.K.; RUMMO, N.J. & JAMES, F.B. — Behavioral and neurological effects of symptomatic and asymptomatic lead exposure in children. *Arch. environ. Health*, 34:120-4, 1979.
12. SNODIN, D.J. — Lead and cadmium in baby foods. *J. Assoc. publ. Anal.*, 11:112-9, 112-9, 1973.
13. STEINBOCK, R.T. — Lead ingestion in history. *New Engl. J. Med.*, 301: 277, 1979.

Recebido para publicação em 9 de dezembro de 1981.

## VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE AFLATOXINA B<sub>1</sub> EM PASTA DE AMENDOIM E PAÇOCA CONSUMIDAS NO ESTADO DE SÃO PAULO \*

Myrna SABINO \*\*  
Emiko I. INOMATA \*\*  
Leda C. A. LAMARDO \*\*

RIALA6/544

SABINO, M.; INOMATA, E.I. & LAMARDO, L.C.A. — Variação dos níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> em pasta de amendoim e paçoca consumidas no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):39-44, 1982.

RESUMO: Aflatoxina B<sub>1</sub> foi identificada, por cromatografia em camada delgada, em 50 amostras de pasta de amendoim e 106 amostras de paçoca (amendoim torrado, pilado, com farinha, açúcar e água), expostas ao consumo no Estado de São Paulo. Os limites detectados para esta aflatoxina foram de 10 a 278 µg/kg. As variações dos níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> nas amostras estudadas foram expressas em várias tabelas e gráfico.

DESCRITORES: aflatoxina B<sub>1</sub>, determinação em pasta de amendoim e em paçoca; amendoim, paçoca, determinação de aflatoxina B<sub>1</sub>; cromatografia em camada delgada.

### INTRODUÇÃO

Alguns fungos são capazes de produzir metabólitos secundários que são tóxicos e, algumas vezes, cancerígenos tanto para o homem como para os animais. Estes fungos são chamados toxicogênicos e os metabólitos são denominados micotoxinas.

Entre maio e agosto de 1960, mais de 100.000 peruzinhos morreram na Inglaterra por causa desconhecida; no ano seguinte, foi comprovado que uma toxina produzida por *Aspergillus flavus* contaminou as tortas de amendoim (provenientes, entre outros países, do Brasil) consumidas por estas aves, causando-lhes a morte. Posteriormente essa toxina foi denominada aflatoxina B<sub>1</sub>.

A aflatoxina tem sido encontrada numa grande variedade de alimentos e rações; ficou comprovado que ela, além de altamente tóxica, é também cancerígena para várias espécies de animais<sup>2</sup>.

O incidente da Inglaterra poderia ter sido considerado somente em seu aspecto veterinário, não fosse comprovada a ação carcinogênica da aflatoxina, o metabólito responsável pela intoxicação.

Desde a primeira identificação da aflatoxina B<sub>1</sub>, pelo menos quinze outras aflatoxinas e seus derivados já foram isolados. Entre elas, as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> são as mais comuns.

Devido ao alto risco de contaminação de alguns produtos por aflatoxina B<sub>1</sub>, especialmente amendoim, e aos grandes prejuízos que ela pode causar ao organismo humano e animal, alguns países, inclusive o Brasil<sup>1</sup>, já estabeleceram limite de tolerância para esta aflatoxina.

O estabelecimento em diversos países do mundo de limites de tolerância para a aflatoxina criou impasse para países exportadores, dificultando a venda de seus produtos e ameaçando suas balanças comerciais; para países importadores aumentaram as dificuldades na obtenção de suprimentos agrícolas e, conseqüentemente, diminuiu a quantidade de alimento disponível. Daí a importância do problema, tanto econômico como de saúde para o homem e os animais.

A aflatoxina B<sub>1</sub> pode prejudicar não só os animais bem como atingir o homem, pois o amendoim que é ingerido "in natura" ou sob a forma de confeitos, como pés-de-moleque,

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

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

paçoquinhas, pasta de amendoim, pode estar contaminado.

Baseados nestas considerações, resolvemos fazer um levantamento da ocorrência da aflatoxina B<sub>1</sub> em pastas de amendoim e paçocas consumidas em São Paulo.

Em 1969 fizemos estudo preliminar em farinhas de amendoim e verificamos que, praticamente, todas estas farinhas destinadas à fabricação de rações animais continham aflatoxina B<sub>1</sub> em quantidades superiores a 1.000 µg/kg (ppb)<sup>3</sup>. Do mesmo modo, farinha de amendoim destinada ao consumo humano apresentava-se contaminada por esta aflatoxina. Posteriormente, passamos ao controle desta toxina em rações e grupos de alimentos de diferentes regiões geográficas do país<sup>4</sup> pois o Instituto Adolfo Lutz, Centro Colaborador do Programa Conjunto FAO/OMS para Monitoramento de Contaminação de Alimentos, remete anualmente a esta organização dados analíticos sobre aflatoxinas, bem como de resíduos de pesticidas e contaminantes metálicos.

#### MATERIAL E MÉTODO

Foram analisadas 50 amostras de pasta de amendoim e 106 amostras de paçoca para determinar aflatoxina B<sub>1</sub>.

As 50 amostras de pasta de amendoim foram adquiridas nos supermercados da cidade

de São Paulo; das 106 amostras de paçoca provenientes de várias cidades do Estado de São Paulo, e da Capital, 54 são de produtos industrializados, de diferentes marcas comerciais.

O método empregado para análise foi o descrito por PREGNOLATTO & SABINO<sup>3</sup>, com pequenas modificações: no solvente para desenvolvimento do cromatograma e na técnica para avaliação da aflatoxina B<sub>1</sub>.

A técnica consiste em pesar 30 g da amostra (triturada em liquidificador no caso de paçoca) e extrair a gordura em aparelho de Soxhlet. Do material desengordurado extrair com 100 ml de clorofórmio em agitador mecânico, durante duas horas. Filtrar em papel Whatman n.º 1 e concentrar (a filtração, por ser lenta, deverá ser feita através de uma camada de terra diatomácea, tal como celite. Utilizar o extrato clorofórmico obtido para identificação e quantificação da aflatoxina B<sub>1</sub>, por cromatografia em camada delgada. Desenvolver o cromatograma com benzeno — acetato de etila — etanol (30:19:1). Sob luz ultravioleta, comparar a mancha fluorescente correspondente à aflatoxina B<sub>1</sub> da amostra com a de um padrão.

#### RESULTADOS

Os resultados obtidos estão demonstrados nas tabelas 1, 2, 3 e 4, onde se verifica a

TABELA 1

*Níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> em pasta de amendoim*

N.º de amostras analisadas	Marca	Níveis de aflatoxina B <sub>1</sub> µg/kg (ppb)
2	A	21
2	A	26
1	A	35
2	A	10
1	A	16
1	A	47
1	A	13
1	A	8
9	A	N.D.*
15	B	N.D.
1	B	13
1	B	26
1	B	35
2	B	40
1	B	50
5	C	N.D.
1	D	N.D.
1	D	25
1	E	167
1	E	278
<b>Total</b> 50		

\* N.D. = Não aparecimento de fluorescência no cromatograma.



SABINO, M.; INOMATA, E.I. & LAMARDO, L.C.A. — Variação dos níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> em pasta de amendoim e paçoca consumidas no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):39-44, 1982.

evidência de aflatoxina B<sub>1</sub> em várias amostras. A figura apresenta a variação dos níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> nas amostras de paçoca de produto de origem caseira ou industrializado.

Os teores de aflatoxina B<sub>1</sub> foram expressos em µg/kg (ppb) e o não aparecimento de fluorescência no cromatograma foi representado pela abreviatura N.D. (não detectada).

TABELA 2

*Níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> em paçoca industrializada*

N.º de amostras analisadas	Marca	Níveis de aflatoxina B <sub>1</sub> µg/kg (ppb)
4	A	N.D.*
1	A	22
3	B	N.D.
1	B	52
2	C	N.D.
1	D	N.D.
1	E	N.D.
1	E	30
1	F	30
1	F	25
4	F	N.D.
1	F	90
3	F	10
1	F	42
2	F	20
2	G	25
3	H	N.D.
1	H	104
3	H	40
1	H	50
1	H	25
1	H	20
1	H	220
1	I	N.D.
3	J	N.D.
1	K	8
2	K	N.D.
1	L	65
1	L	N.D.
1	L	40
1	M	N.D.
1	M	17
1	N	N.D.
1	O	45
<b>Total</b> 54		

\* N.D. = Não aparecimento de fluorescência no cromatograma.

TABELA 3

*Níveis de aflatoxina em paçoca de origem caseira provenientes de cidades do Estado de São Paulo*

N.º de amostras analisadas	Procedência	Níveis de aflatoxina B <sub>1</sub> µg/kg (ppb)
1	Socorro	22
1	São Bernardo do Campo	20
2	São Bernardo do Campo	26
3	Andradina	N.D.*
1	Andradina	20
2	Murutinga do Sul	N.D.
1	Murutinga do Sul	260
1	Mirassol	163
1	São José do Rio Preto	11
1	Catanduva	N.D.
1	Mirandópolis	195
1	Mirandópolis	10
1	Mirandópolis	40
1	Bauru	130
1	Bauru	33
1	Diadema	50
1	São Paulo	156
2	São Paulo	17
1	São Paulo	32
5	São Paulo	8
2	São Paulo	16
4	São Paulo	20
2	São Paulo	40
12	São Paulo	N.D.
1	Campinas	20
1	Adamantina	33
1	Guaraçai	N.D.
Total 52		* N.D. = Não aparecimento de fluorescência no cromatograma.

TABELA 4

*Tabela demonstrativa dos valores de aflatoxina B<sub>1</sub> em pasta de amendoim e paçoca*

Amostras analisadas						
Tipo	N.º	Negativas		Positivas acima de 30 µg/kg*		
		n.º	%	n.º	%	média µg/kg
Pasta de amendoim	50	30	60	9	18	86,5
Paçoca caseira	52	9	17,3	12	23	80,8
Paçoca industrializada	54	27	50	14	26	63,4

\* A legislação brasileira fixou tolerância de 30 µg/kg (ppb) para as aflatoxinas calculada pela soma dos conteúdos das aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>. Esta tabela demonstra somente conteúdo de aflatoxina B<sub>1</sub>.

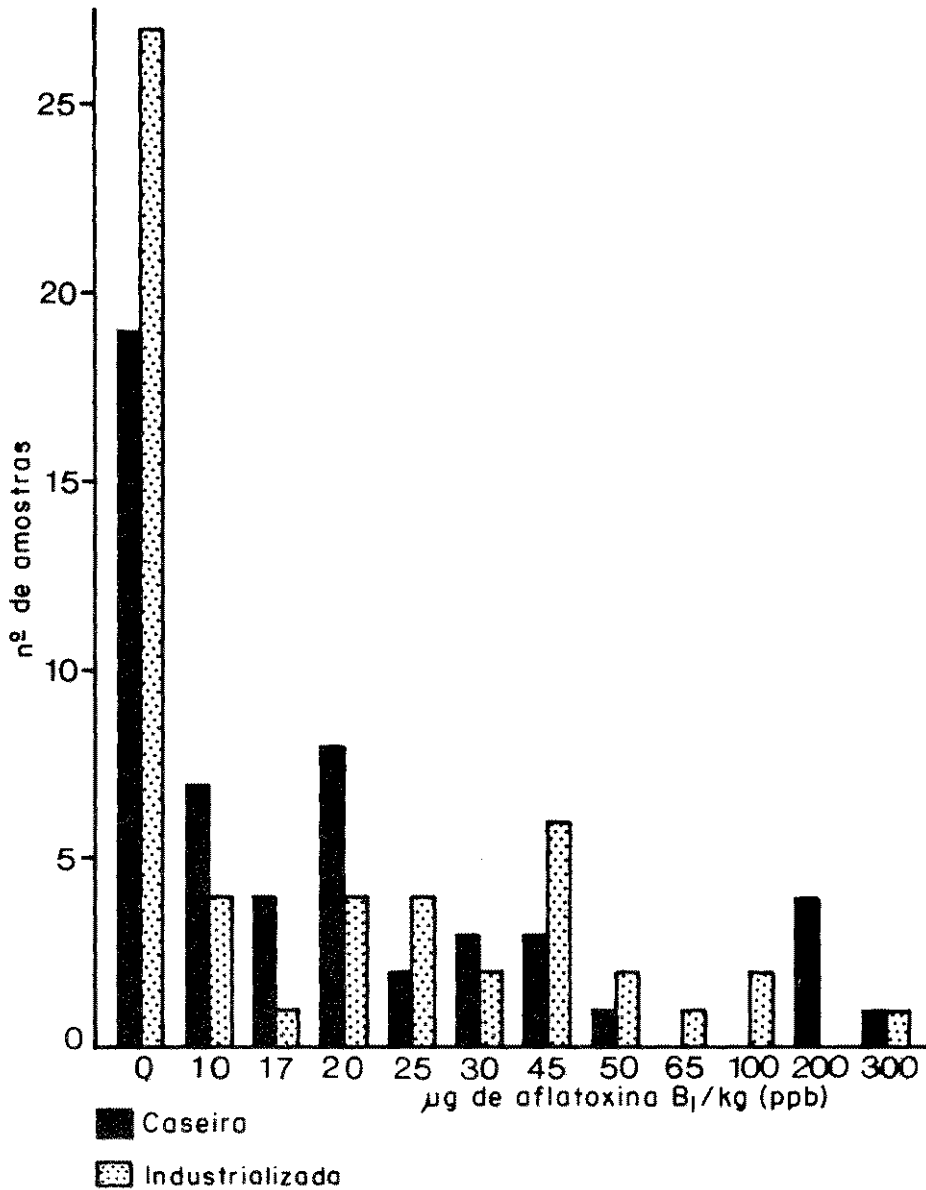


FIGURA — Variação dos níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> em amostras de paçoca de origem caseira ou industrializada.

### CONCLUSÃO

Pelos resultados apresentados, pode-se observar que a aflatoxina B<sub>1</sub> esteve presente em várias amostras de pasta de amendoim e, principalmente, em amostras de paçoca.

Nota-se que foi detectada aflatoxina B<sub>1</sub> em concentração de até 278 µg/kg. A legislação brasileira, através da resolução 34/76, fixou para os alimentos a tolerância de 30 µg/kg para as aflatoxinas<sup>1</sup>, calculadas pela soma dos conteúdos das aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>.

Considerando que a paçoca tem como principal alvo o consumo pela população infantil, notadamente na Merenda Escolar, é necessário proteger seus consumidores com a mesma

intensidade com que são protegidos contra outros poluentes ambientais.

Acreditamos que a solução para o problema da aflatoxina depende de mudanças de comportamento, como a aproximação entre pesquisadores e representantes do setor produtivo do país. É preciso que sejam destruídos preconceitos existentes em ambos os lados. É certo que, para se combater com sucesso e em definitivo a poluição por micotoxinas (aflatoxinas), faz-se necessária a educação, em todos os aspectos, para conservação, proteção e desenvolvimento do ambiente. A orientação é condição essencial, sem a qual não existirá melhoramento ou progresso. Propósitos governamentais terão somente efeito paliativo se não for dada ênfase à educação e conscientização da população e ao treinamento do pessoal especializado nesta área.

RIALA6/544

SABINO, M.; INOMATA, E.I. & LAMARDO, L.C.A. — Variation of the content of aflatoxin B<sub>1</sub> in peanut paste and peanut sweet bars consumed in São Paulo State, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):39-44, 1982.

ABSTRACT: Thin-layer chromatography was employed for determining the amount of aflatoxin B<sub>1</sub> in 50 samples of peanut paste and peanut sweet bars for sale in various places of the state of São Paulo. The levels determined ranged from 10 to 278 mg/kg and are presented in tables and graphs.

DESCRIPTORS: aflatoxin B<sub>1</sub>, determination in peanut paste and in paçoca (sweet bar); peanut, paste, aflatoxin B<sub>1</sub> determination; peanut, paçoca, aflatoxin B<sub>1</sub> determination; thin-layer chromatography.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução n.º 34-76. *Diário Oficial*, Rio de Janeiro, 19 jan. 1977. Seção I, pt. 1, p. 710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos.
2. DETROY, R.W.; LILLEHOJ, E.B. & CIEGLER, A. apud LIN, M.T. — Biologia dos fungos toxicogênicos. In: ENCONTRO NACIONAL [DE] MICOTOXINAS: PROBLEMAS E SOLUÇÕES. São Paulo, 1980. *Anais*. São Paulo, 1980. p. 11-22.
3. PREGNOLATTO, W. & SABINO, M. — Pesquisa e dosagem de aflatoxina em amendoim e derivados e em outros cereais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30:65-71, 1969/70.
4. SABINO, M. — Variações de níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> em alimentos e Rações animais no período de 1971 a 1979. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40:153-8, 1980.

Recebido para publicação em 3 de fevereiro de 1982.

## RESÍDUOS DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS EM LEITE HUMANO, SÃO PAULO, BRASIL, 1979-1981 \*

Walkyria H. LARA \*\*  
Heloisa H. C. BARRETTO \*\*  
Odete N. K. INOMATA \*\*

RIALA6/545

LARA, W.H.; BARRETTO, H.H.C. & INOMATA, O.N.K. — Resíduos de pesticidas organoclorados em leite humano, São Paulo, Brasil, 1979-1981. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):45-52, 1982.

**RESUMO:** Um estudo foi feito na cidade de São Paulo, Brasil, com 25 amostras de leite humano obtido de doadoras no Banco de Leite do Hospital do Servidor Público do Estado de São Paulo, e de algumas voluntárias. Isômeros de HCH e metabolitos de DDT foram encontrados em todas as amostras e, em apenas uma, foi encontrado dieldrin. Os níveis de HCH total (soma dos isômeros alfa, beta e gama) estão entre 3  $\mu\text{g/l}$  e 758  $\mu\text{g/l}$ , mas 90% das amostras apresentaram valores abaixo de 38  $\mu\text{g/l}$ . Para o complexo de DDT (somatória de p-p'DDE e p-p'DDT), os níveis estão entre 10  $\mu\text{g/l}$  e 2610  $\mu\text{g/l}$ . Este máximo de 2610  $\mu\text{g/l}$  é muito mais alto que os outros níveis encontrados, pois 80% das amostras estão abaixo de 318  $\mu\text{g/l}$ .

**DESCRITORES:** leite humano, análise; pesticidas organoclorados (resíduos), determinação em leite humano; cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons.

### INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental por resíduos de pesticidas organoclorados tem sido altamente estudada em razão da persistência e acumulação na cadeia alimentar desses compostos.

O exame dos fluídos biológicos e tecido adiposo humano tem servido como índice do nível de contaminação das populações, causada pela poluição do ambiente e, principalmente, dos alimentos.

O leite humano tem sido objeto de investigações de resíduos de pesticidas desde 1951, quando LAUG *et alii*<sup>7</sup> encontraram resíduos de DDT em 30 das 32 amostras analisadas. Desde então, inúmeros estudos têm sido feitos em várias áreas rurais e urbanas, servindo como indicador da contaminação do meio ambiente pelos organoclorados.

O Programa Conjunto FAO/OMS de Monitoramento da Contaminação de Alimentos e Rações inclui o leite materno entre os alimentos em que se devem pesquisar os níveis de organoclorados. O relatório desse programa mostra as variações observadas nos vários países que realizam esse controle. Uma avaliação desses níveis em São Paulo, Brasil, empregando o método utilizado pela "U.S. Environmental Protection Agency (EPA)"<sup>4</sup>, foi obtido pela análise de 25 amostras de leite humano, sendo um composto de 15 amostras colhidas junto ao Banco de Leite do Hospital do Servidor Público do Estado de São Paulo, coletadas de fevereiro a março de 1979, e outro misto de 4 amostras de leite de voluntárias e 6 amostras do Banco de Leite do Hospital do Servidor Público do Estado de São Paulo, coletadas em diferentes datas de 1981.

\* Realizado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 5.º Congresso Internacional de Química de Pesticidas da IUPAC, Kyoto, 1982.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

## MATERIAL E MÉTODO

### Material

O histórico das amostras provenientes do Hospital do Servidor Público do Estado de São Paulo, coletadas de doadoras normais do Banco de Leite, está exposto na tabela 1; o histórico das doadoras de leite das voluntárias está na tabela 2.

As amostras do Banco de Leite foram obtidas por sucção mecânica para frascos de vidro de 20 ml, com tampa, e congeladas até o momento da extração dos pesticidas, nunca excedendo a 70 horas. As demais foram coletadas manualmente para frascos de vidro e feita a extração imediatamente.

### Reagentes

Sulfato de sódio anidro granulado, p.a.

Hexana, acetonitrila e material (isentos de impurezas para cromatografia em fase gasosa, nas condições de análise)

Florisil, 60-110 "meshes", ativado a 650°C

Padrões de pesticidas organoclorados

### Equipamento

Centrifuga com capacidade rotacional de 2.000 rpm

Concentrador de evaporação de 10 ml com coluna modificada (micro Snyder Cat. Kontes n.º R — 569250)

Funil de separação de 50 ml

Concentrador Kuderna-Danish de 150 ml

Microcolunas de vidro de 20 cm de comprimento por 1,0 cm de diâmetro interno, preparadas como segue: colocar uma pequena porção de algodão na extremidade inferior de uma microcoluna, em seguida colocar 1,6 g de florisil e, logo após, adicionar 1,6 g de sulfato de sódio anidro granulado. Lavar a coluna com 50 ml de metanol e, em seguida, com 50 ml de hexana e deixar em estufa a 135°C, durante uma noite. Para rotina de trabalho é conveniente preparar um grande número de colunas ao mesmo tempo e guardá-las na estufa até o momento de serem usadas.

TABELA 1

*Histórico das doadoras normais do Banco de Leite do Hospital do Servidor Público do Estado de São Paulo, Brasil*

N.º	Idade (anos)	Zona de procedência	Contato com a lavoura
1	25	urbana	não
2	39	rural	não
3	36	rural	não
4	18	urbana	não
5	30	rural	não
6	35	rural	sim
7	38	urbana	não
8	34	urbana	não
9	28	rural	sim
10	24	urbana	não
11	35	rural	não
12	36	rural	não
13	35	urbana	não
14	27	urbana	não
15	35	rural	não
16	30	urbana	não
17	27	urbana	não
18	25	urbana	não
19	35	urbana	não
20	(*)	urbana	não
21	(*)	urbana	não

(\*) Não foi fornecida.

TABELA 2

*Histórico das doadoras de leite voluntárias, Estado de São Paulo, Brasil*

N.º	Idade (anos)	Zona de procedência	Contato com a lavoura
22	29	urbana	não
23	27	urbana	não
24	28	urbana	não
25	29	rural	sim

#### Método

O método usado foi o da EPA<sup>4</sup>, com pequena diferença na tomada da amostra, que foi de 1 ml e não de 500 mg, como recomendado, por razões de facilidade de medida. Consiste no seguinte:

**Extração:** Colocar 1 ml da amostra de leite em tubo de centrífuga de 15 ml e adicionar 2,5 ml de acetoneitrila e 0,1 ml de hexana contendo 20 ng de aldrin (serve como referência na recuperação, e para marcar o tempo de retenção relativa). Centrifugar e passar o sobrenadante com auxílio de uma pipeta Pasteur para um funil de separação de 50 ml. Repetir a extração duas vezes com 2,5 ml de acetoneitrila.

Reunir os extratos do funil de separação. Adicionar 25 ml de solução aquosa, a 2%, de sulfato de sódio. Agitar e extrair com três porções de 5,2 e 2 ml de hexana. Reunir os extratos em concentrador Kuderna-Danish de 150 ml e concentrar até mais ou menos 5 ml. Retirar a coluna de Vigreux e colocar a microcoluna Snyder para concentrar até 0,3 ml.

**Partição com florissil<sup>4</sup>** Tirar da estufa a microcoluna de florissil (preparada anteriormente) e deixar atingir a temperatura ambiente. Umedecer com 10 ml de hexana e desprezar o eluato. Transferir o extrato concentrado para o topo da coluna e iniciar imediatamente a eluição, passando um total de 12 ml de hexana, em seguida, 12 ml de solução de metanol a 1%, em hexana. Reunir os eluatos em concentrador Kuderna-Danish. Esta fração I pode conter: heptaclor, aldrin, p-p'DDE, o-p'DDT e p-p'DDT. Coletar uma segunda fração em outro concentrador Kuderna-Danish, eluindo com mais 12 ml de solução de metanol a 1%, em hexana. Esta fração II pode conter dieldrin, heptaclorepoxi, endrin, alfa-HCH, beta-HCH, gama-HCH e p-p'DDD. Evaporar ambas as frações e ajustar o volume para 1 ml. Proceder à determinação dos organoclorados, por cromatografia em fase gasosa.

**Observações:** a) Preparar um branco para cada série de amostras, passando por todas as etapas do método. b) Beta-HCH, gama-

-HCH e p-p'DDD podem aparecer em pequena quantidade na fração I.

**Cromatografia em fase gasosa:** Foram usados dois cromatógrafos com as seguintes especificações:

a) Cromatógrafo Varian Aerograph 2.100-00, com detector de captura de elétrons, fonte de trítium e com coluna de vidro, em forma de U, de 1/4 de polegada de diâmetro interno, 6 pés de comprimento com fase estacionária 2,5% de QF-1 mais 2,5 de DC-200 em Chromosorb W, 100-120 "meshes", nas seguintes condições: temperatura da coluna, 190°C; temperatura do injetor, 210°C; temperatura do detector, 210°C; fluxo do nitrogênio, 40 ml/min.

b) Cromatógrafo CG-370 com detector de captura de elétrons, fonte de trítium e com coluna de vidro espiral de 1/8 de polegada de diâmetro interno, 6 pés de comprimento, com fase estacionária de 2% OV-17 em Chromosorb W, 100-120 "meshes", nas seguintes condições: temperatura da coluna, 204°C; temperatura do injetor, 216°C; temperatura do detector, 218°C; fluxo de nitrogênio, 40 ml/min.

A sensibilidade dos aparelhos foi ajustada de modo a se obter uma deflexão de 50% da escala do registrador, com 60 picogramas de aldrin, com ruído de 0,1 mm.

As bifenilas policloradas (PCBs), se presentes, poderiam ser detectadas num limite mínimo de 1 mg/l, sendo que não foi evidenciada a presença de PCBs em nenhuma das amostras. Caso isto tivesse ocorrido, dever-se-ia modificar a técnica de extração, pois os picos de PCBs iriam interferir nos resultados.

## RESULTADOS

Todas as amostras analisadas continham alguns dos seguintes pesticidas organoclorados: alfa-HCH, beta-HCH, gama-HCH, p-p'DDE e p-p'DDT. A tabela 3 apresenta os resultados das análises feitas e a tabela 4 mostra os valores dos isômeros de HCH reunidos como HCH total e os isômeros e metabólitos de DDT como somatória de DDT.

Na comparação dos resultados em nosso país, com os de outros estudos em outros países, uma dificuldade bastante grande é apresentada pela diferente forma de expressão dos resultados: ppm, ppb, mg/kg,  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mg/l,  $\mu\text{g}/\text{l}$ , expressos no leite total ou na gordura. São de grande importância as recomendações de uniformização que têm sido feitas nos últimos anos pelas organizações internacionais FAO e OMS.

Os níveis de HCH total variaram de 3  $\mu\text{g}/\text{l}$  a 758  $\mu\text{g}/\text{l}$ , com média de 49  $\mu\text{g}/\text{l}$  e 90º percentil de 38  $\mu\text{g}/\text{l}$ , sendo que apenas duas amostras apresentaram valores acima de 100  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Os níveis da somatória de DDT variaram de 15  $\mu\text{g}/\text{l}$  a 2.610  $\mu\text{g}/\text{l}$  (sendo este valor encontrado na mesma amostragem que apresentou 758  $\mu\text{g}/\text{l}$  de HCH total), com média de 278  $\mu\text{g}/\text{l}$  e 90º percentil de 686  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

TABELA 3

*Níveis dos pesticidas organoclorados em leite humano ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )*

Amostra n.º	$\alpha$ -HCH	$\gamma$ -HCH	$\beta$ -HCH	p-p'DDE	p-p'DDT
01	10	1	2	209	30
02	4	2	3	144	22
03	19	13	1	564	150
04	6	2	1	252	61
05	16	18	140	142	42
06	1	5	9	142	36
07	8	6	6	180	30
08	5	6	1	630	56
09	32	66	660	1752	858
10	13	1	1	160	1
11	11	12	15	55	40
12	5	3	6	60	39
13	10	8	14	72	22
14	4	5	9	135	40
15	6	3	4	267	44
16	2	1	1	28	1
17	3	3	1	291	27
18	1	1	1	22	1
19	2	1	1	15	1
20	1	1	1	23	1
21	1	1	1	23	1
22	1	2	1	26	1
23	2	1	1	74	1
24*	6	1	1	105	1
25**	1	1	1	76	1

\* Nesta amostra foi encontrado 1  $\mu\text{g}/\text{l}$  de p-p'DDD.

\*\* Nesta amostra foram encontrados 2  $\mu\text{g}/\text{l}$  de Dieldrin.



TABELA 4  
Níveis do HCH total e somatória de DDT em leite humano ( $\mu\text{g/l}$ )

Amostra n.º	HCH total	$\Sigma$ DDT
01	13	239
02	9	166
03	33	714
04	9	313
05	174	184
06	15	178
07	20	210
08	12	686
09	753	2610
10	15	161
11	33	95
12	14	99
13	32	94
14	18	175
15	13	311
16	4	29
17	7	318
18	3	23
19	4	16
20	3	24
21	3	24
22	4	27
23	4	75
24	8	106
25	3	77

### DISCUSSÃO

Em 1951, LAUG *et alii*<sup>7</sup>, em Washington, Estados Unidos, num estudo de 32 amostras de leite humano, verificaram a presença de DDT em 30, com um mínimo de 0,01 ppm e um máximo de 0,77 ppm.

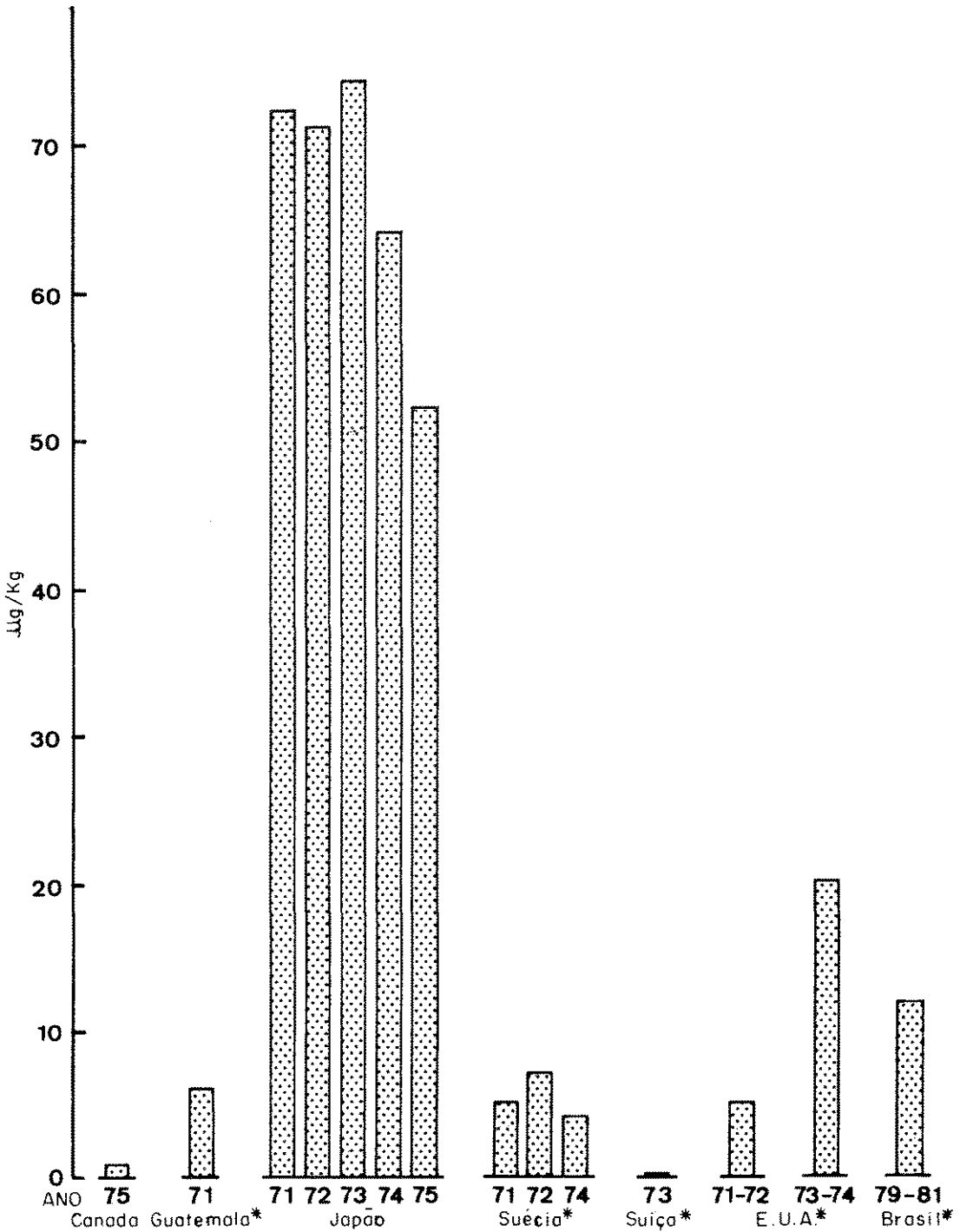
SAVAGE *et alii*<sup>8</sup>, no período de 1971 a 1972, analisaram 40 amostras de leite de mulheres que moravam na zona rural do Colorado, EUA. Neste trabalho foi relatada a presença de resíduos de p-p'DDE e p-p'DDT em todas as amostras, de beta-HCH em 87,5% das mesmas, dieldrin em 45% e PBCs, em 20%; os mais altos níveis encontrados foram os de p-p'DDE, num intervalo de 19 a 386 ppb na gordura do leite, e p-p'DDT entre 70 a 109 ppb na gordura do leite.

STRASSMAN & KUTZ<sup>9</sup>, de 1973 a 1974, analisaram 57 amostras coletadas de doadoras que residiam em diferentes regiões de Arkansas e Mississipi, EUA. Todas as amostras indicaram que houve exposição das mães ao DDT, com um valor médio de contaminação de 0,344 ppm de DDT total. Este trabalho relata, ainda, a presença de beta-HCH, dieldrin e heptacloropoxi em algumas amostras analisadas.

Em 1979, CURRIE *et alii*<sup>2</sup> descreveram dois estudos de determinação de resíduos de pesti-

cidas organoclorados na gordura do leite, feitos em Alberta, Canadá, no período de 1966 a 1970, e de 1977 a 1978. Os resultados mostraram a presença de beta-HCH em todas as amostras coletadas no período de 1977 a 1978, e a ausência no período de 1966 a 1970. Verificaram, também, que os níveis de p-p'DDT em metabolitos foram substancialmente mais baixos no segundo estudo do que no primeiro. Para alfa-HCH, no primeiro período, a média foi de 0,107 ppm e, no segundo, 0,109 ppm; para p-p'DDT, no primeiro período, 1,14 ppm e, no segundo, 0,437 ppm. Todos esses dados indicaram uma diminuição nos valores que foram encontrados no primeiro período, mas mostraram um aumento no número de pesticidas encontrados. Os autores atribuem esse fato a uma mudança no uso de pesticidas na região e uma melhoria das técnicas de análise. Verificaram, também, que não havia correlação entre os valores encontrados e a idade das doadoras.

Em 1981, DILLON *et alii*<sup>3</sup> analisaram 154 amostras de leite materno, em Quebec, Canadá. Verificaram que 30% das amostras analisadas excediam o valor de 1,25 mg/kg de DDT na gordura do leite, limite esse estabelecido pela Comissão do Codex Alimentarius para leite de vaca. Dado importante neste



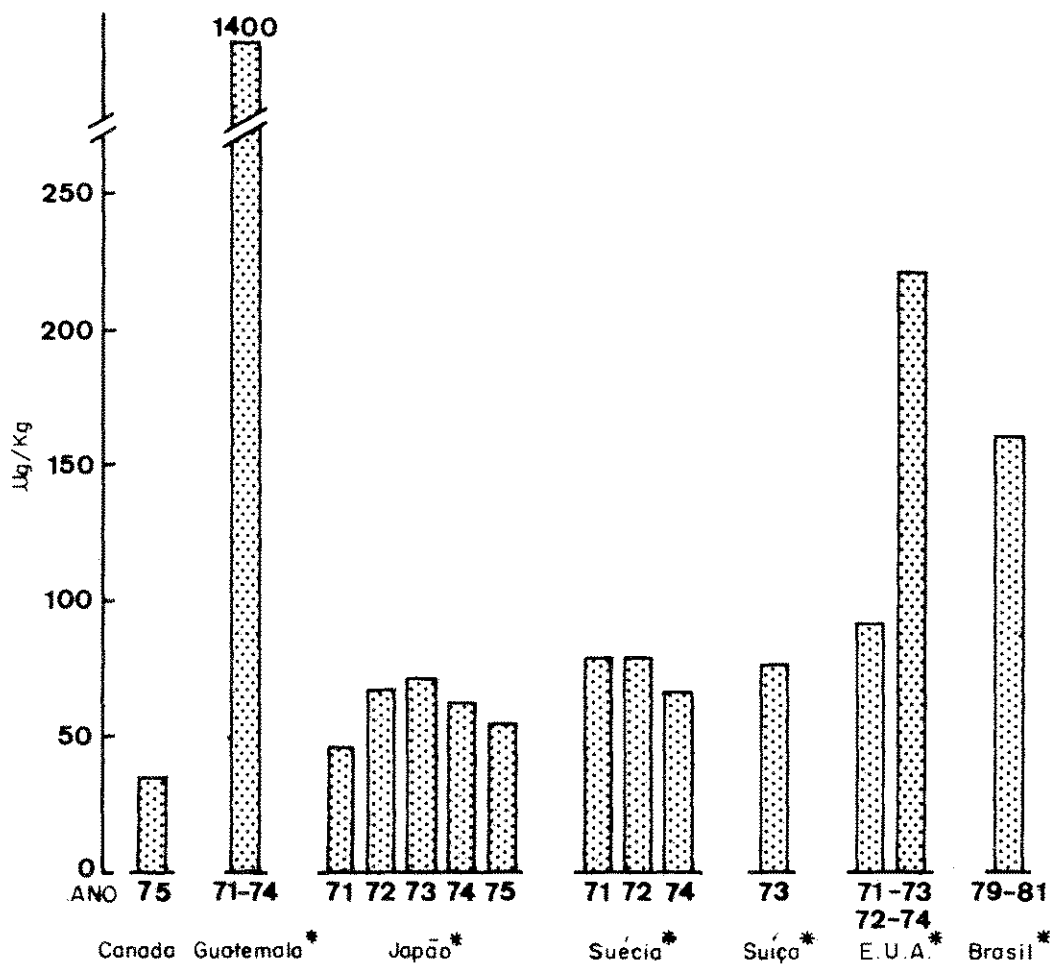
\*Não representativo do país como um todo.

FIGURA 1 — Comparação da mediana de HCH total, em leite humano, São Paulo, Brasil, com as medianas dos relatórios dos Centros Colaboradores do Programa Conjunto FAO/OMS de Monitoramento de Contaminação de Alimentos.

trabalho foi a correlação positiva entre as mães que fumavam e a quantidade de resíduo de p-p'DDE encontrado na gordura do leite.

CAMPOS & OLSZINA-MARZYS<sup>1</sup>, estudando a contaminação do leite materno, na Guatemala e em El Salvador, encontraram resultados bastante elevados para DDT, com médias de até 3,54 ppm, em Escuintla, região algodoeira da Guatemala, e de 0,695 ppm em Santiago de Maria, em El Salvador. Relatarem, também, a existência de resíduos de outros organoclorados em leite materno, tais como HCH, dieldrin, heptacloropóxido.

Nos relatórios dos Centros Colaboradores do Programa Conjunto FAO/OMS de Monitoramento de Contaminação de Alimentos<sup>2</sup>, o Japão, em 1975, apresentou, para o leite materno, a mediana de 54  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para HCH total, enquanto que a encontrada por nós, no Brasil, foi de 13  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Os valores encontrados pela Suíça, Suécia, Guatemala, Estados Unidos e Canadá foram inferiores a 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Se compararmos a mediana da somatória de DDT de 161  $\mu\text{g}/\text{l}$ , notaremos que está próxima da encontrada pelos Estados Unidos, em 1974, que foi de 215  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (fig. 1 e 2).



\* Não representativo do país como um todo.

FIGURA 2 — Comparação da mediana da somatória de DDT, em leite humano, São Paulo, Brasil, com as medianas dos relatórios dos Centros Colaboradores do Programa Conjunto FAO/OMS de Monitoramento de Contaminação de Alimentos.

RIALA6/545

LARA, W.H.; BARRETTO, H.H.C. & INOMATA, O.N.K. — Organochlorine pesticide residues in human milk, São Paulo, Brazil, 1979-1981. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):45-52, 1982.

**ABSTRACT:** A survey was carried out in the city of São Paulo, Brazil, 25 samples obtained in the milk bank of the "Hospital do Servidor Público do Estado de São Paulo", Brasil, as well from some volunteering nursing women. The method of analysis was that described by the Manual of Methods for Pesticide Residues in Human and Environmental Samples — EPA-USA. HCH isomers and metabolites of DDT were found in all samples but just one showed dieldrin. The levels of HCH total (sum of alpha, beta and gamma isomers) ranged from 3 to 758  $\mu\text{g/l}$ , but 90% of the samples had levels below 38  $\mu\text{g/l}$ . For the complex DDT (sum of metabolites) the levels ranged from 16 to 2610  $\mu\text{g/l}$ . This maximum is very far from the other levels because 80% of the samples remained below 318  $\mu\text{g/l}$ .

**DESCRIPTORS:** milk, human, analysis; organochlorine pesticide residues in milk, detection; electron capture gas-liquid chromatography.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMPOS, M. & OLSZYNA-MARZYS, A.E. — *Plaguicidas clorados en leche humana, en Guatemala y en El Salvador*. [Apresentado ao Seminário sobre Química Ambiental e Ecotoxicologia, São Paulo, 1977] 21 p.
2. CURRIE, R.A.; KADIS, V.W.; BREITKREITZ, W.E.; CUNNINGHAM, G.B. & BRUNS, G.W. — Pesticide residues in human milk, Alberta, Canada — 1966-1970, 1977-1978. *Pestic. monit. J.*, 13:52-5, 1979.
3. DILLON, J.C.; MARTIN, G.B. & O'BRIEN, H.T. — Pesticide residues in human milk. *Food Cosmet. Toxicol.*, 19:437-42, 1981.
4. ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency, Environmental Toxicology Division. *Analysis of pesticide residues in human and environmental samples: a compilation of methods selected for use in pesticide monitoring programs*. Revisions by A.O.A.C. Research Triangle Park, N.C., 1980. Seção 5, A(2), (a) & (b), p. 1-5.
5. JOINT/FAO/WHO Food and animal feed contamination monitoring programme, Phase II. *Summary report of data received from collaborating centres for food contamination monitoring*. Stage 1-1977. Genève, 1978. [FAO: ESN/MON/78.2. WHO: HCS/FCM/78.2]
6. LARA, W.H.; BARRETTO, H.H.C. & INOMATA, O.N.K. — Variação dos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados em leite consumido na cidade de São Paulo em 1979. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40:65-73, 1980.
7. LAUG, E.P.; KUNZE, F.M. & PRICKETT, C.S. — Occurrence of DDT in human fat and milk. *Arch. ind. Hyg. occup. Med.*, 3:245-6, 1951.
8. SAVAGE, E.P.; TESSARI, J.D.; MALBERG, J.W.; WHEELER, H.W. & BAGBY, J.R. — Organochlorine pesticide residues and polychlorinated biphenyls in human milk, Colorado — 1971-1972. *Pestic. monit. J.*, 7:1-5, 1973.
9. STRASSMAN, S.C. & KUTZ, F.W. — Insecticide residues in human milk from Arkansas and Mississippi, 1973-74. *Pestic. monit. J.*, 10:130-3, 1977.

Recebido para publicação em 26 de março de 1982.

## NÍVEIS DE NITRATOS EM HORTALIÇAS \*\*

Walkyria H. LARA \*\*  
Mickiko Y. TAKAHASHI \*\*

RIALA6/546

LARA, W.H. & TAKAHASHI, M.Y. — Níveis de nitratos em hortaliças. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):53-57, 1982.

**RESUMO:** Para avaliar a variação dos níveis de nitratos existentes em hortaliças frescas, como alface, batata, cenoura, couve e espinafre, foram analisadas amostras dessas hortaliças, coletadas ao acaso em feiras livres da cidade de São Paulo. As amostras de espinafre apresentaram consistentemente níveis altos de nitratos, com um mínimo de 545 mg/kg e um máximo de 4136 mg/kg, com uma média de 2030 mg/kg e um 90.<sup>o</sup> percentil de 3306 mg/kg, enquanto que algumas amostras de batata não apresentaram nitratos, havendo um máximo de 748 mg/kg, uma média de 145 mg/kg e 90.<sup>o</sup> percentil de 370 mg/kg. As amostras de alface, cenoura e couve apresentaram variações consideráveis, não sendo encontrados nitratos em algumas amostras ou atingindo, por vezes, valor bastante alto, como o de uma amostra de couve, o mais alto encontrado neste estudo, 5896 mg/kg.

**DESCRITORES:** nitratos em hortaliças frescas, determinação; hortaliças frescas, determinação de nitratos.

### INTRODUÇÃO

As plantas possuem um teor natural de nitratos que constitui uma fonte do nitrogênio necessário ao seu desenvolvimento. Esta presença de nitratos, principalmente em hortaliças, pode-se constituir, em alguns casos, em contribuição apreciável na ingestão diária de nitratos. WALKER<sup>9</sup> chegou a fazer uma estimativa da ingestão média de nitratos por semana, mostrando que, para um consumidor normal, os vegetais representam um quarto do total de nitratos ingeridos.

LEE<sup>6</sup> relata os estudos de Miyasaki sobre a influência de fertilizantes no acúmulo de nitratos nos vegetais, e de Sobdeva que, em estudos com vários vegetais cultivados com ou sem fertilizantes, mostrou que os cultivados sem fertilizantes tinham níveis de nitratos de 3 a 12 vezes menores que os cultivados com fertilizantes.

Nitratos por si mesmo não representam o maior problema do ponto de vista toxicológico,

mas sim os nitritos que se formam a partir dos nitratos. PHILLIPS<sup>7</sup> considera que, se um alimento contém um nível bastante alto de nitratos, isto representa um risco pois, nas condições de processamento ou armazenamento, a conversão dos nitratos é maior.

O risco toxicológico da ingestão de nitratos também tem sido amplamente investigado, assim como a formação de nitrosaminas<sup>8</sup>, e a possível metaemoglobinemia em crianças de tenra idade<sup>6</sup>.

Uma ingestão diária aceitável (IDA) de 0 a 5 mg/kg de peso corpóreo foi estabelecida pelo Grupo de Peritos da FAO/OMS, conhecido como JECFA<sup>2</sup>.

Na tecnologia de alimentos, o uso de nitratos na produção de queijos ou conservas de carnes está regulamentado, não podendo exceder a 200 mg/kg, calculados em nitrato de sódio, no produto a ser consumido<sup>1</sup>.

Além dos alimentos processados, a água potável e hortaliças representam outra fonte

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

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

de nitratos na dieta usual, tornando-se necessário controlar os níveis de nitratos nestes últimos alimentos.

O nível de nitratos existentes em hortaliças frescas é susceptível de variações; a fim de avaliá-lo, foram analisadas várias amostras coletadas, ao acaso, em feiras-livres na cidade de São Paulo.

Neste primeiro levantamento foram escolhidas as hortaliças mais comuns na dieta usual da população, como alface, batata, cenoura, couve e espinafre, e comparados os valores encontrados com os de outros estudos em outros países.

### MATERIAL

Foram analisadas 100 amostras de hortaliças adquiridas nas feiras-livres da cidade de São Paulo, sendo 20 de alface, 20 de batata, 20 de cenoura, 20 de couve e 20 de espinafre.

### MÉTODO

Foi usado o método descrito por LARA *et alii*<sup>4</sup>, que consiste no seguinte:

#### Reagentes

##### Para obtenção do extrato

Solução de cloreto de cádmio: dissolver 50 g de  $CdCl_2$  e 50 g de  $BaCl_2$  em água destilada e completar o volume de um litro, em balão volumétrico. Ajustar o pH = 1,0, com ácido clorídrico.

Solução de hidróxido de sódio a 10%, p/v

##### Para obtenção da coluna

Solução de sulfato de cádmio a 20%  
Zinco em bastão

##### Para determinar nitrato

Solução tampão (pH 9,6-9,7): adicionar 20 ml de ácido clorídrico concentrado a 500 ml de água destilada. Agitar e adicionar 50 ml de hidróxido de amônia concentrado e completar o volume de 1.000 ml.

##### Para desenvolvimento da cor

Solução de alfa-naftol: aquecer 360 ml de água destilada e 50 ml de ácido acético a 50°C e transferir para um frasco escuro contendo 0,25 g de ácido sulfanílico. Agitar até dissolver e adicionar 0,20 g de alfa-naftol, agitando bem. Esfriar à temperatura ambiente e adicionar 90 ml de solução de  $NH_4OH$  a 10%. O pH desta solução deve ser  $4,0 \pm 0,5$ .

##### Preparação da coluna

Preparar uma coluna estirando uma das pontas de um tubo de vidro de 1,5 cm de diâmetro e 12 cm de comprimento. Adaptar ao topo da coluna um funil de separação de 50

ml, com haste de 1 mm de diâmetro interno e 25 cm de comprimento.

Colocar de 2 a 3 bastões de zinco em um béquer contendo cerca de 100 ml da solução de sulfato de cádmio a 20%. Remover, com uma vareta de vidro, o depósito esponjoso formado depois de 2 a 3 horas, e colocá-lo em um béquer contendo água destilada. Transferir o cádmio formado para o copo de liquidificador, com o auxílio de aproximadamente 200 ml de água destilada, e triturar durante 1 a 2 segundos. Passar na peneira de 20 a 40 malhas. Colocar na extremidade afilada da coluna um pouco de lã de vidro seguida de uma camada de 1 cm de areia e transferir o cádmio para até quase o topo da mesma, mantendo-a sempre com água. Adaptar o funil de separação à coluna através de uma rolha de cortiça, para prevenir a entrada de ar na coluna, mantendo-a sempre com água.

Antes da determinação do nitrato, lavar a coluna com 25 ml de HCl 0,1 N; em seguida, com 50 ml de água destilada e, finalmente, com 25 ml de solução tampão diluída a 1:9 com água destilada.

Quando o cádmio esponjoso é mantido de baixo d'água, sua atividade decresce depois de 24 horas. A eficiência de redução da coluna deve ser sempre controlada. Esta pode ser regenerada por passagens sucessivas de porções de HCl 0,1 N, água e tampão, como descrito acima.

*Eficiência da coluna:* testar a eficiência da coluna passando soluções padrões de  $NaNO_2$  através da mesma, determinar a quantidade de nitrato, de acordo com o procedimento descrito adiante e calcular a porcentagem de recuperação (os dados obtidos com a coluna por nós usada estão configurados na tabela 1). Quando a recuperação for inferior a 90%, regenerar a coluna da seguinte maneira: desmontar a coluna, transferir o cádmio para um béquer contendo HCl 2N e deixar por um minuto. Em seguida, montar a coluna novamente, passar 50 ml de água destilada e 25 ml da solução tampão diluída 1:9.

##### Curva padrão de nitrato de sódio

Pesar 0,46 g de  $AgNO_2$  e dissolver em 100 ml de água destilada quente. Transferir a solução obtida e as águas de lavagem correspondentes às três lavagens com 30 ml de água destilada para um balão volumétrico de 1.000 ml. Pesar 0,25 g de NaCl e adicionar ao balão, completando o volume com água destilada; agitar. Deixar decantar. Pipetar 5 ml do sobrenadante e transferir para um balão volumétrico de 100 ml, completando o volume com água destilada. Um mililitro desta solução corresponde a 10 microgramas de  $NaNO_2$ .

Pipetar alíquotas (de 0,25 a 10 ml) desta solução para balões volumétricos de 25 ml. Adicionar 5 ml da solução tampão e 10 ml do reagente para desenvolver cor. Completar o volume com água. Colocar os balões à temperatura de 25 a 30°C durante 30 minutos para

TABELA 1

*Eficiência da coluna na recuperação de nitritos e nitratos*

Quantidade de NaNO <sub>3</sub> passada na coluna μg	Valor teórico de NaNO <sub>2</sub> correspondente a NaNO <sub>3</sub> μg	Valor encontrado em NaNO <sub>2</sub> μg	Recuperação %
4	3,24	3,33	102,7
8	6,48	6,66	102,7
12	9,72	9,66	99,3
20	16,20	16,60	102,4
40	32,40	32,66	101,7
56	45,36	46,32	102,1

desenvolvimento da cor. Esfriar à temperatura ambiente e ler em espectrofotômetro em cela de 1 cm a 474 nm usando como branco a solução contendo 10 ml do reagente para desenvolver cor, 5 ml da solução tampão, e 10 ml de água destilada.

Com os valores obtidos construir a curva padrão.

#### *Procedimento*

##### *Preparo da amostra*

Pesar 10 g da amostra, transferir para o copo do liquidificador e triturar com auxílio de 25 ml de água (batata e cenoura devem estar descascadas). Transferir para um balão volumétrico de 200 ml com auxílio de 50 ml de água, lavar o copo do liquidificador e adicionar 50 ml da solução de cloreto de cádmio. Agitar e deixar descansar por uma hora, agitando ocasionalmente. Adicionar 10 ml de solução de hidróxido de sódio. Completar o volume com água e filtrar imediatamente em papel de filtro isento de nitrito. O filtrado está pronto para ser passado na coluna de cádmio.

##### *Determinação de nitrato*

Pipetar 20 ml da solução desproteïnizada para um bquer de 150 ml e adicionar 5 ml da solução tampão. Colocar o conteúdo no funil de separação e passar pela coluna de cádmio a uma velocidade de 5 ml/min rejeitando os primeiros 10 ml. Passar água destilada através da coluna até recolher 100 ml do eluado em balão volumétrico, tomando cuidado para que a coluna não seque. Pipetar 10 ml do eluado para balão volumétrico de 25 ml, adicionar 5 ml da solução tampão, 10 ml do reagente para desenvolver cor. Deixar em banho-maria a 25 — 30°C durante 30 min. Esfriar à temperatura ambiente, fazer a medida em cela de 1 cm em espectrofotômetro, usando como branco uma solução contendo

10 ml do reagente para desenvolver cor, 5 ml da solução tampão e água destilada.

Calcular o valor de nitrito, usando a curva padrão. Para se obter o valor de nitrato na amostra, multiplicar o valor encontrado pelo fator 1,231.

#### RESULTADOS

Os resultados estão relacionados pelo número da amostra, tipo de hortaliça, e são expressos em nitrato de sódio (tabela 2). Por esses resultados pode-se ver que as amostras de espinafre apresentaram consistentemente níveis altos de nitratos, com um mínimo de 545 mg/kg e um máximo de 4136 mg/kg, com uma média de 2030 mg/kg e um 90.<sup>o</sup> percentil de 3306 mg/kg, enquanto que algumas amostras de batata não apresentaram nitratos, havendo um máximo de 748 mg/kg, uma média de 145 mg/kg e um 90.<sup>o</sup> percentil de 370 mg/kg. As amostras de alface, cenoura e couve apresentaram consideráveis variações no nível de nitrato, não sendo encontrado em algumas amostras, ou atingindo, por vezes, valores bastante altos como o da amostra n.<sup>o</sup> 15, de couve, o mais alto encontrado neste estudo, 5.896 mg/kg (tabela 3).

#### DISCUSSÃO

Comparados os valores obtidos por outros autores, como os relacionados por WALKER<sup>9</sup>, pode-se ver que a média de 317 mg/kg encontrada por Jackson *et alii*, em 1976, e a de 352 mg/kg encontrada por Rantur *et alii*, em 1972, em amostras de couve, são bem menores que aquela por nós encontrada, que foi de 1975 mg/kg. Nas amostras de alface, Sobdeva, em 1969, e Lemieszch-Chodorowskan, em 1972, encontraram máximos de 3547 mg/kg, respectivamente<sup>9</sup>, enquanto que, nas amostras por nós analisadas, a média foi de 1.245 mg/kg.

TABELA 2

Níveis de nitratos, em nitrato de sódio, em hortaliças diversas, provenientes de feiras livres na cidade de São Paulo

NaNO <sub>3</sub> em mg/kg					
Amostras	Alface	Batata	Cenoura	Couve	Espinafre
1	129	—	—	822	1613
2	248	748	317	2137	1081
3	409	74	—	2447	729
4	1525	132	74	952	3306
5	577	—	312	658	2973
6	1804	35	354	323	545
7	1595	55	52	1898	1587
8	194	61	431	652	1948
9	63	—	240	857	1102
10	882	188	263	683	1922
11	1159	—	136	775	831
12	2091	63	420	1594	1057
13	1361	139	371	2203	1625
14	1419	78	245	1989	2732
15	3294	46	726	5896	3782
16	2076	200	331	4350	3151
17	339	94	525	3891	4136
18	3076	379	675	4631	2273
19	1260	249	355	1911	2278
20	1728	370	240	830	1947

O sinal (—) indica: não desenvolvimento de cor.

TABELA 3

Varição dos níveis de nitratos, em nitrato de sódio, nas amostras analisadas

Nitratos, em nitrato de sódio mg/kg				
Amostras	Valores			
	Máximo	Mínimo	Média aritmética	90.º percentil
Alface	3294	63	1261	2091
Batata	748	0	145	370
Cenoura	726	0	303	525
Couve	5896	323	1975	4631
Espinafre	4136	545	2030	3306



Nas amostras de espinafre, a média de 1910 mg/kg, obtida por Richardson, em 1907<sup>9</sup>, é próxima àquela por nós encontrada, isto é, 2030 mg/kg. Ainda para o espinafre, Lemieszeg-Chodorowska, em 1972, relataram um máximo de 3413 mg/kg<sup>9</sup>.

### CONCLUSÃO

Apesar do pequeno número de amostras, os níveis de nitratos encontrados nas diversas

hortaliças analisadas, quando comparados aos encontrados por outros autores, mostram variações, sendo consistentemente altos apenas para o espinafre.

É necessário um estudo maior da possível correlação entre os níveis de nitratos encontrados nas hortaliças e os diferentes tipos de solo, fertilizantes, migração, e outros fatores que podem alterar esses níveis.

RIAL6/546

LARA, W.H. & TAKAHASHI, M.Y. — Nitrate levels in fresh vegetables sold in São Paulo City, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):53-57, 1982.

**ABSTRACT:** Samples of lettuce, carrot, cabbage, spinach, and potato were collected in free markets of São Paulo City, Brazil. High levels of nitrates were consistently found in spinach samples and they ranged from 545 to 4136 mg per kg (mean: 2030 mg, and 90th percentile: 3306 mg/kg). Several samples of potatoes showed from 0 to 748 mg/kg. The samples of lettuce, carrot and cabbage showed considerable variation which ranged from no nitrates to very high values such as 5896 mg/kg found in one sample.

**DESCRIPTORS:** nitrate in fresh vegetables, determination; vegetables, fresh, nitrate determination.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução normativa n.º 08-79 da Câmara Técnica de Alimentos do Conselho Nacional de Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, DF, 1.º jun. 1979. Seção I, pt. I, p. 7843. Revoga a Resolução n.º 9-76 da CNNPA.
2. COMITÉ MIXTE FAO/OMS D'EXPERTS DES ADDITIFS ALIMENTAIRES. Genève, 1973. *Evaluation toxicologique de certains additifs alimentaires; examen des principes généraux et des normes*. 17 ème rapport. Genève, OMS, 1974. p. 37. [OMS Sér. Rapp. techn. n.º 539]
3. HAMILTON, J.E. — Collaborative study of the colorimetric determination of nitrate and nitrite in cheese. *J. Assoc. off. Agric. Chem.*, 59:284-8, 1976.
4. LARA, W.H.; TAKAHASHI, M.Y. & YABIKU, H.Y. — Níveis de nitratos em alimentos infantis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40: 147-52, 1980.
5. LEE, C.Y.; SHALLENBERGER, R.S.; DOWNING, D.L.; STOLWSAND, G.S. & PECK, N.M. — Nitrate and nitrite nitrogen in fresh stored and processed table and spinach from different levels of field nitrogen fertilisation. *J. Sci. Food Agric.*, 22:90-2, 1971.
6. LEE, D.H.K. — *Nitrates, nitrites and methaemoglobinemia*. Environmental review n.º 2. North Carolina, National Institute of Environmental Health Sciences, 1970.
7. PHILLIPS, W.E.J. — Changes in the nitrite contents of fresh and processed spinach during storage. *J. agric. Food Chem.*, 16: 88-91, 1968.
8. SEBRANEK, J.G. & CASSENS, R.G. — Nitrosamines: a review. *J. Milk Food Technol.*, 36:76-91, 1973.
9. WALKER, R. — Naturally occurring nitrate/nitrite in foods. *J. Sci. Food Agric.*, 26: 1735-42, 1975.

Recebido para publicação em 30 de março de 1982.



## RESPOSTA AO PENTETRAZOL EM CAMUNDONGOS ALBINOS COM INFECÇÃO CRÔNICA POR *TOXOPLASMA GONDII* \*

Pedro Paulo CHIEFFI \*\*  
Edson do NASCIMENTO \*\*\*

RIALA6/547

CHIEFFI, P.P. & NASCIMENTO, E. — Resposta ao pentetrazol em camundongos albinos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 42(1/2):59-62, 1982.

**RESUMO:** Estudou-se a resposta de camundongos albinos, mantidos em laboratório com infecção crônica por cepa de baixa virulência de *Toxoplasma gondii* a várias dosagens de pentetrazol, administrado por via intra-peritoneal. Como grupo controle, utilizaram-se camundongos de mesma linhagem, isentos de infecção toxoplasmótica. Ambos os lotes de animais, divididos em cinco grupos, receberam doses subletais de pentetrazol de 32, 36, 38, 41 e 44 mg/kg de peso, com o objetivo de avaliar a ocorrência de mioclonias, "congelamento" e convulsões clônico-tônicas. Observou-se menor sensibilidade à droga no lote de animais infectados por *T. gondii*, talvez por alteração de processos de regulação do sistema nervoso central.

**DESCRIPTORIOS:** toxoplasmose; camundongos albinos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii*, resposta ao pentetrazol.

### INTRODUÇÃO

A infecção por *Toxoplasma gondii* é largamente disseminada em natureza, atingindo inúmeras espécies de animais silvestres e domésticos<sup>9, 10</sup> além da espécie humana e determinando, nesta, quadros de gravidade muito variável.

No homem, a infecção por *T. gondii* tem distribuição cosmopolita, mostrando-se presente, com taxa de risco cumulativa, praticamente em todas as faixas etárias<sup>7</sup>. Não é rara a infecção congênita quando a mãe desenvolve toxoplasmose aguda durante a gestação<sup>1, 2</sup>.

Nas infecções toxoplasmóticas de caráter crônico surgem, nos tecidos do hospedeiro, cistos que não se acompanham de reação inflamatória apreciável e contém grande número de formações conhecidas como bradizoítas<sup>3</sup>. O sistema nervoso central é um dos pontos de eleição para a localização destes cistos.

Pouco se sabe sobre a ação do parasita no organismo do hospedeiro quando determina quadros aparentemente assintomáticos, caracterizados pela presença de cistos nos tecidos. Recentemente, demonstrou-se que camundongos com infecção crônica por *T. gondii* apresentam alterações de comportamento com diminuição da resposta a certos estímulos<sup>4, 5, 6</sup>. Por outro lado, tem aumentado o interesse em se estudar o comportamento de animais infectados por *T. gondii*, pela possibilidade de existir correlação entre certas alterações e a presença de cistos do parasita no sistema nervoso central do hospedeiro. No presente trabalho estuda-se a resposta de camundongos albinos experimentalmente infectados por cepa cistogênica, de baixa virulência, de *T. gondii* ao pentetrazol, droga utilizada como estimulante do sistema nervoso central.

### MATERIAL E MÉTODOS

Empregaram-se 260 camundongos albinos de idade equivalente, divididos em dois lotes

\* Realizado no Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

\*\*\* Ex-acadêmico de Medicina da Universidade Estadual de Londrina.

de 130 animais. O primeiro lote foi infectado com 4 a 5 cistos de bradizoítas de *T. gondii*, provenientes de cepa de baixa virulência para camundongos e mantida em laboratório há mais de dois anos. Os cistos foram obtidos por sacrifício de camundongo infectado e homogenização de seu cérebro em solução fisiológica estéril. Após 90 dias, sacrificaram-se 10 animais deste lote para confirmar a presença de parasitismo no sistema nervoso central. O segundo lote de camundongos, que constituiu o grupo controle, foi mantido sem infecção em condições semelhantes e, na mesma época, sacrificaram-se 10 animais para excluir a presença de cistos de *T. gondii* no sistema nervoso central, através do exame de homogenato do cérebro.

Em ambos os grupos determinou-se a DL 50 para pentetrazol, utilizando-se 20 camundongos de cada lote e obtendo-se resultado semelhante (70 mg/kg).

Os camundongos restantes de ambos os lotes foram divididos em cinco grupos de 20 animais que receberam doses de pentetrazol, por via intra-peritoneal, de 32, 36, 38, 41 e 44 mg/kg de peso, respectivamente, com o objetivo de avaliar a resposta a dosagens subletais da droga e o limiar de convulsão em ambos os lotes.

Além da ocorrência de convulsões clônico-tônicas, avaliou-se o surgimento de mioclonias e de "congelamento" (reação caracterizada

pela adoção de postura estática, com a cauda em riste) em ambos os grupos, até 15 minutos após a administração do pentetrazol.

## RESULTADOS

Observou-se diminuição da sensibilidade ao estímulo pelo pentetrazol no grupo de camundongos infectados por *T. gondii*. Assim, com relação ao aparecimento de mioclonias, 100% dos camundongos não infectados apresentaram este tipo de reação quando receberam dose de pentetrazol de 36 mg/kg de peso, enquanto no grupo infectado por *T. gondii*, com a mesma dosagem, esta resposta foi obtida em apenas 25% dos animais testados. Da mesma forma, enquanto a totalidade dos camundongos não infectados que receberam pentetrazol na dose de 38 mg/kg de peso desenvolveram reação caracterizada por "congelamento", com dosagem semelhante, nenhum animal do grupo infectado apresentou esta reação. Com relação ao limiar de convulsão, administrando-se a droga nas doses de 36 e 44 mg/kg, respectivamente 30 e 60% dos camundongos do grupo não infectado apresentaram convulsões clônico-tônicas e, no grupo infectado, em apenas 25% dos animais notou-se resposta positiva quando se utilizou a dose de 44 mg/kg.

Os resultados estão sumarizados na tabela abaixo:

TABELA

Porcentagem de camundongos, infectados e não-infectados por *Toxoplasma gondii*, que apresentaram reações à administração de pentetrazol, por via intra-peritoneal

Resposta	Doses (mg)	Camundongos infectados (%)					Camundongos não-infectados (%)				
		32	36	38	41	44	32	36	38	41	44
Mioclonia		30	100	—	—	—	0	25	25	30	50
Congelamento		30	50	100	—	—	0	0	0	0	50
Convulsão		0	30	30	50	60	0	0	0	0	25

## DISCUSSÃO

A infecção por determinados parasitas pode alterar o comportamento do hospedeiro, como, por exemplo, ocorre na cisticercose do sistema nervoso central.

Em outras situações, embora o parasita não se localize em estruturas do sistema nervoso do hospedeiro, podem também ocorrer alterações no comportamento e na resposta do hospedeiro a certos estímulos do ambiente.

Infecções agudas por *Schistosoma mansoni*, em camundongos e ratos, podem determinar redução da capacidade de aprendizagem destes animais, possivelmente por atuar sobre sua mobilidade, conduzindo-os a um estado de letargia<sup>8, 11, 12</sup>, enquanto infecções de curso prolongado por este trematódeo, não interferem com o desempenho de ratos<sup>13</sup>.

No caso de infecções causadas por *T. gondii* também já se relataram modificações no comportamento do hospedeiro. HUTCHISON & col<sup>4</sup>

<sup>5, 6</sup> mostraram que camundongos infectados por cepas de baixa virulência de *T. gondii* apresentaram menor capacidade de reagir a estímulos novos, além de se verificarem distúrbios motores e de equilíbrio, talvez por ocorrerem alterações em processos de regulação do sistema nervoso central, em consequência da presença de cistos do parasita.

Os resultados encontrados no presente trabalho sugerem diminuição da resposta ao pentetrazol, droga estimulante do sistema nervoso central, em camundongos infectados cronicamente por *T. gondii*. O surgimento de mioclonias e congelamento foi menos freqüente nos animais infectados, quando comparados aos do grupo controle inoculados com a mesma dose-

gem de pentetrazol. Ao mesmo tempo, nos animais não infectados foram necessárias doses inferiores da droga para desencadear-se convulsões clônico-tônicas.

Não se conhece explicação para o fenômeno acima relatado, nem a metodologia empregada no presente trabalho permite levantar hipóteses sobre os mecanismos através dos quais a infecção crônica por *T. gondii* alteraria processos de regulação do sistema nervoso central do hospedeiro, levando-o a reagir de forma menos intensa à administração de substância estimulante. Todavia, a simples constatação deste fenômeno é relevante, especialmente quando se considera o grande número de indivíduos com infecções crônicas, geralmente inaparentes, que existe em natureza.

RIALA6/547

CHIEFFI, P. P. & NASCIMENTO, E. — Response to pentetrazol in white mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2): 59-62, 1982.

**ABSTRACT:** The response to various doses of pentetrazol was studied in white mice chronically infected with a low-virulence strain of *Toxoplasma gondii*. Uninfected mice of the same source were also tested. The rate of occurrence of myoclonic reactions, freezing, and convulsion after sub-lethal doses of pentetrazol was studied through administration of 32, 36, 38, 41 and 44 mg per kg of animal weight, respectively, to each of twenty mice. Low rates of response under all tested parameters was observed; this presumably resulting from an alteration in the regulatory mechanism of the central nervous system.

**DESCRIPTORS:** toxoplasmosis; mice, white, chronically infected with *Toxoplasma gondii*, response to pentetrazol.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APT, W. — Transmission congenita de protozoos parasitos. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.*, 72:517-42, 1972.
2. CASTILHO, E.A. — An estimation of the incidence of congenital toxoplasmosis in São Paulo city, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 18:202-5, 1976.
3. HOARE, C.A. — The developmental stages of *Toxoplasma*. *J. trop. Med. Hyg.*, 75: 56-8, 1972.
4. HUTCHISON, W.M.; AITKEN, P.P. & WELLS, B.W.P. — Chronic *Toxoplasma* infections and familiarity-novelty discrimination in the mouse. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 74:145-50, 1980.
5. HUTCHISON, W.M.; AITKEN, P.P. & WELLS, B.W.P. — Chronic *Toxoplasma* infections and motor performance in the mouse. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 74: 507-10, 1980.
6. HUTCHISON, W.M.; BRADLEY, M.; CHEYNE, W.M.; WELLS, B.W.P. & HAY, J. — Behavioural abnormalities in *Toxoplasma*-infected mice. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 74:337-45, 1980.
7. JAMRA, L.M.F. & GUIMARÃES, E.C. — Conversão sorológica para toxoplasmosose em crianças de um centro de saúde de São Paulo. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 23:133-7, 1981.
8. KERSHAW, W.E.; LEYTHAM, G.W.H. & DICKERSON, G. — The effect of schistosomiasis on animal intelligence. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 53:504-8, 1959.
9. MC COLM, A.A.; HUTCHISON, W.M. & SIIM, J.C. — The prevalence of *Toxoplasma gondii* in meat animals and cats in Central Scotland. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 75:157-64, 1981.
10. SIIM, J.C.; BIERING-SORENSEN, U. & MOLLER, T. — Toxoplasmosis in domestic animals. *Adv. Vet. Sci.*, 8:335-429, 1963.

11. STRECH, R.G.A.; LEYTHAM, G.W.H. & KERSHAW, W.E. — The effect of acute schistosomiasis upon learning in rats under different levels of motivation. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 54:487-92, 1960.
12. STRECHT, R.G.A.; STRECHT, S.J.E.; LEYTHAM, G.W.H. & KERSHAW, W.E. — The effect of schistosomiasis upon discrimination learning and activity in mice. I. An acute infection. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 54:376-80, 1960.
13. STRECHT, S.J.E.; STRECHT, R.G.A.; LEYTHAM, G.W.H. & KERSHAW, W.E. — Discrimination learning and schistosomiasis in the rat: a low-grade infection of several months' duration. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 54:483-6, 1960.

*Recebido para publicação em 6 de abril de 1982.*

## ANTICORPOS ANTI-RETICULINA EM SOROS DE CAMUNDONGOS ALBINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *SCHISTOSOMA MANSONI* \*

Mirthes UEDA \*\*  
Pedro Paulo CHIEFFI \*\*\*  
Roberto A. Pinto PAES \*\*\*  
Paulo M. NAKAMURA \*\*  
Roselisa da Silva GORDINHO \*\*\*\*

RIALA6/548

UEDA, M.; CHIEFFI, P.P.; PAES, R.A.P.; NAKAMURA, P.M. & GORDINHO, R.S. — Anticorpos anti-reticulina em soros de camundongos albinos experimentalmente infectados por *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2): 63-66, 1982.

RESUMO: Determinou-se a frequência de anticorpos anti-reticulina no soro de camundongos experimentalmente infectados por *Schistosoma mansoni*, procurando avaliar o seu surgimento e o grau de reatividade conforme o tempo de infecção, através de reação de imunofluorescência indireta em cortes de rim humano. Entre 50 camundongos infectados por *S. mansoni*, 48 (96%) apresentaram reação positiva de intensidade variável; em 31 (64,5%) notou-se reação de intensidade fraca e em 17 (35,5%) a intensidade foi considerada forte. Entre 10 camundongos do grupo controle, não infectado, não se encontrou nenhuma reação positiva para anticorpos anti-reticulina. No grupo de camundongos infectados notou-se tendência a maior grau de reatividade entre os animais com infecção crônica, reforçando a hipótese de que existe relação entre alterações mensenquimais em doenças crônicas e a presença de anticorpos anti-reticulina.

DESCRIPTORIOS: esquistossomose mansônica; anticorpos anti-reticulina na esquistossomose mansônica; camundongos albinos, anticorpos anti-reticulina no soro, frequência.

### INTRODUÇÃO

A presença, no soro de seres humanos, de anticorpos que reagem contra estruturas do tecido conjuntivo foi assinalada pela primeira vez por SEAH *et alii*<sup>9</sup>, em pacientes com doença celíaca e dermatite herpetiforme. Quase ao mesmo tempo, ALP & WRIGHT<sup>1</sup> descreveram este mesmo tipo de anticorpo, denominado "anti-reticulina", em soros de pacientes com doença de Crohn.

Em 1974, COSSIO *et alii*<sup>2</sup> descreveram, no soro de pacientes chagásicos, a existência de anticorpos que reagem contra estruturas vasculares, endoteliais e intersticiais de tecidos de camundongos, identificando-os pela sigla E.V.I. e, em publicações posteriores<sup>3, 6</sup>, atribuíram importância diagnóstica a este achado.

Em nosso meio<sup>7</sup>, demonstrou-se que a existência deste tipo de anticorpos e de determinados padrões de fluorescência em tecidos não

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

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

\*\*\* Do Instituto Adolfo Lutz, e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP.

\*\*\*\* Da Faculdade de Ciências Médicas da SCMSP.

são achados exclusivos da infecção chagásica, ocorrendo em mais de 70% dos soros de pacientes com esquistossomose crônica.

No presente trabalho estuda-se a frequência de anticorpos anti-reticulina em soros de camundongos experimentalmente infectados por *Schistosoma mansoni*, procurando determinar-se a duração do período de infecção tem influência em seu surgimento e grau de reatividade.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 65 camundongos albinos, cepa A/SN, machos, com aproximadamente dois meses de idade, divididos em dois lotes. No primeiro lote, constituído por 55 animais, procedeu-se à infecção por *S. mansoni*, por via percutânea, empregando-se 50 cercárias por camundongo. O segundo lote, composto de 10 animais, constituiu o grupo controle, não infectado. No grupo infectado 5 camundongos morreram durante o experimento, sem poderem ser utilizados; no grupo controle não ocorreu óbito.

Em ocasiões diferentes, entre o 35.<sup>o</sup> e o 280.<sup>o</sup> dias após infecção, sangraram-se, por punção cardíaca, camundongos de ambos os lotes.

Os soros dos camundongos foram examinados, para pesquisa de anticorpos anti-reticulina, empregando-se técnica de imunofluorescência indireta em cortes de rim humano de 4 micrômetros de espessura, obtidos em criostato, conforme descrito por JOHNSON & HOLBOROW<sup>5</sup>. O fragmento de tecido renal humano

utilizado foi obtido por biópsia, para pesquisa de imunocomplexos em glomérulos, com resultado negativo e aspecto histológico normal.

Os soros foram testados com diluição a 1:10 e para a demonstração dos anticorpos anti-reticulina empregou-se soro de coelho antigamaglobulina total de camundongo, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (Instituto Adolfo Lutz). A leitura da reação foi feita com microscópio Zeiss com epi-iluminação, munido de lâmpada de halogênio de 100 watts e 12 volts, com filtros excitador FITC e barreira BG 53.

As reações foram lidas, em experimento cego, por três examinadores diferentes e, quando positivas, o resultado era expresso em cruzes, procurando-se avaliar a intensidade de fluorescência. Considerou-se fraca a fluorescência quando a média das leituras dos três examinadores se manteve entre uma e duas cruzes; acima de duas cruzes a fluorescência foi considerada forte.

#### RESULTADOS

Entre os 50 soros de camundongos infectados por *S. mansoni* que chegaram a ser examinados, em apenas dois não se demonstrou a presença de anticorpos anti-reticulina. Nos 10 soros de camundongos não infectados, em nenhuma ocasião se detectaram anticorpos anti-reticulina.

A tabela abaixo mostra os resultados obtidos com os camundongos do grupo infectado, conforme o tempo de infecção.

TABELA

*Anticorpos anti-reticulina em soros de camundongos experimentalmente infectados por Schistosoma mansoni, conforme tempo de infecção*

Tempo de infecção (dias)	Camundongos infectados (n. <sup>o</sup> )	Soros positivos (n. <sup>o</sup> )	Soros negativos (n. <sup>o</sup> )
35 a 50	6	6	—
60 a 70	12	11	1
80 a 100	15	15	—
160	6	5	1
280	11	11	—
Total	50	48	2



Quando se considerou a intensidade de fluorescência verificou-se que, dos 48 soros positivos, 31 (64,5%) reagiram de forma fraca e 17 (35,5%) apresentaram reatividade forte. Ao distribuir os casos de reatividade fraca e forte conforme o tempo de infecção, notou-se que,

em sua maioria, os soros com reatividade forte pertenciam ao grupo de camundongos com 280 dias de infecção. A figura abaixo indica as variações na intensidade de fluorescência dos soros positivos para anticorpos anti-reticulina, conforme o tempo de infecção por *S. mansoni*.

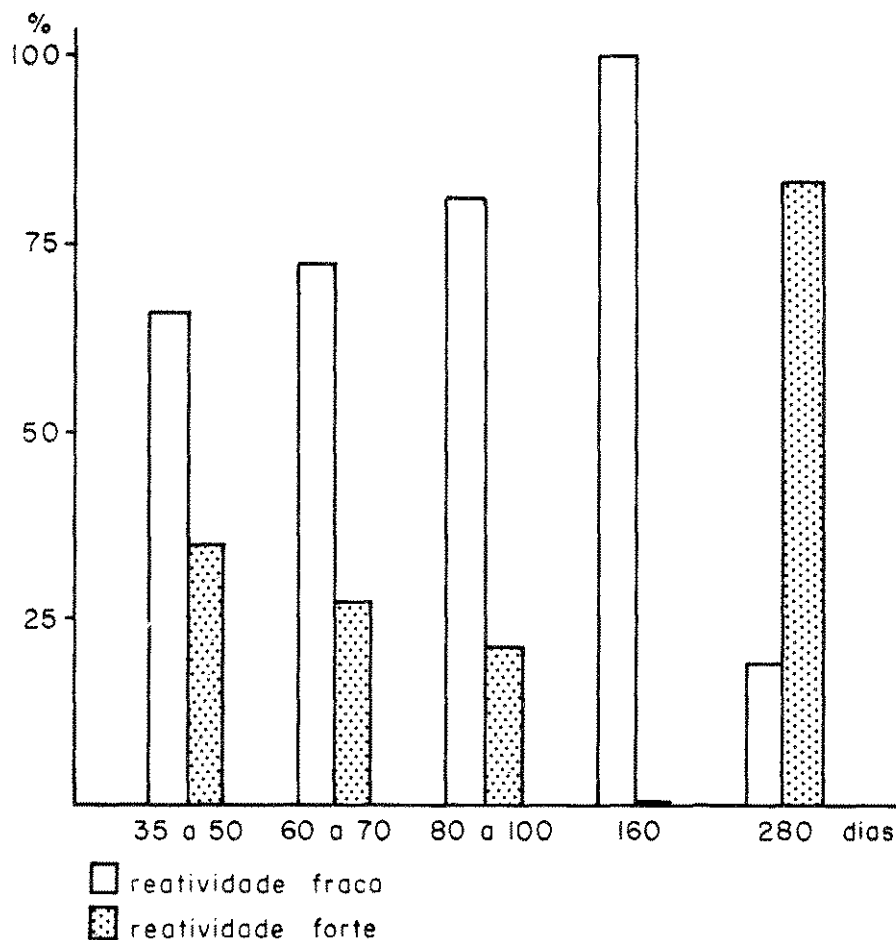


FIGURA — Grau de reatividade de soros positivos para anticorpos anti-reticulina, conforme tempo de infecção.

## DISCUSSÃO

Em trabalho anterior<sup>7</sup> já se demonstrara que soros de pacientes esquistossomóticos reagem freqüentemente com estruturas reticulínicas de diversos órgãos, apresentando um padrão de fluorescência semelhante aos tipos R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, descritos por RIZZETTO & DONIACH<sup>8</sup>. Em consequência, PAES *et alii*<sup>7</sup> concluíram que a presença de anticorpos anti-reticulina pode resultar de alterações no mesênquima em casos de afecções crônicas, não devendo ser considerada patognomônica de qualquer entidade etiológica.

Procurando investigar melhor esta questão em casos de esquistossomose mansônica, obtivemos, no presente trabalho, resultados que corroboram a hipótese de que anticorpos anti-reticulina não representam achado específico ao qual se deva atribuir valor no diagnóstico etiológico, ao contrário do que pensam outros autores<sup>3, 4, 6</sup>.

Nossos resultados mostram que 96% dos camundongos infectados por *S. mansoni* apresentam anticorpos anti-reticulina. Embora nas fases iniciais da infecção já se tenha percebido a existência de soros com grau mais

elevado de reatividade, esta torna-se mais forte nos camundongos submetidos a infecção crônica (ver figura), indicando relação entre o tempo de infecção, intensidade de lesão e o

grau de reatividade. Este achado reforça a hipótese de que a presença de anticorpos anti-reticulina pode-se associar a alterações mesenquimais em doenças crônicas.

RIALAG/548

UEDA, M.; CHIEFFI, P.P.; PAES, R.A.P.; NAKAMURA, P.M. & GORDINHO, R.S. — Anti-reticulin antibodies in sera from white mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):63-66, 1982.

**ABSTRACT:** The rate of occurrence of anti-reticulin antibodies in sera from *S. mansoni*-experimentally infected albino mice was investigated, in order to evaluate its arising and reactivity intensity, according to the infection period of time. Indirect immunofluorescence technique on criostat sections of unfixed snap-frozen human kidney was employed. Forty-eight (96%) of 50 mice with *S. mansoni* infection exhibited positive reactions in variable intensity; 31 (64.5%) sera showed faint staining while brighter staining was shown by 17 (35.5%). Among 10 non-infected mice group, there was virtually no staining. Among the infected mice group, a greater reactivity was observed in chronically infected mice, supporting the hypothesis of a relationship between mesenchymal alterations and the presence of anti-reticulin antibodies.

**DESCRIPTORS:** Manson's schistosomiasis; antibodies, anti-reticulin antibodies in Manson's schistosomiasis; mice, white, anti-reticulin antibodies in sera, frequency.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALP, M.H. & WRIGHT, R. — Auto-antibodies to reticulin in patients with idiopathic steatorrhea, coeliac disease, and Crohn's disease, and their relation to immunoglobulins and dietary antibodies. *Lancet*, 2: 682-5, 1971.
2. COSSIO, P.M.; DIEZ, C.; SZARFMAN, A.; KREUTZER, E.; CANDIOLO, B. & ARANA, R.M. — Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gammaglobulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, 49:13-21, 1974.
3. COSSIO, P.M.; LAGUENS, R.P.; DIEZ, C.; SZARFMAN, A.; SEGAL, A. & ARANA, R.M. — Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation*, 50:1252-9, 1974.
4. HUBSCH, R.M.; SULZER, A.J. & KAGAN, I.G. — Evaluation of an autoimmune type antibody in the sera of patients with Chagas' disease. *J. Parasit.*, 62:523-7, 1976.
5. JOHNSON, G.D. & HOLBOROW, E.J. — Immunofluorescence. In: WEIR, D.M. (ed.) *Handbook of experimental immunology*. 2<sup>th</sup> ed. Oxford. Blackwell, 1973. p. 18.1-18.20.
6. KHOURY, E.L.; COSSIO, P.M.; SZARFMAN, A.; MARCOS, J.C.; MORTEO, O.G. & ARANA, R.M. — Immunofluorescent vascular pattern due to EVI antibody of Chagas' disease. *Am. J. clin. Path.*, 69: 62-5, 1978.
7. PAES, R.A.P.; UEDA, M. & GORDINHO, R.S. — Anticorpos anti-reticulina na esquistossomose crônica. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39:121-5, 1979.
8. RIZZETTO, G.D. & DONIACH, D. — Types of "reticulin" antibodies detected in human sera by immunofluorescence. *J. clin. Path.*, 26:841-51, 1973.
9. SEAH, P.P.; FRY, L. HOFFBRAND, A.V. & HOLBOROW, E.J. — Tissue antibodies in dermatitis herpetiformis and adult coeliac disease. *Lancet*, 1:834-6, 1971.

Recebido para publicação em 6 de abril de 1982.

## ANTICORPOS CIRCULANTES ANTINERVO PERIFÉRICO NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA \*

Pedro Paulo CHIEFFI \*\*  
Roberto A. Pinto PAES \*\*  
Mirthes UEDA \*\*\*  
Paulo M. NAKAMURA \*\*\*  
Lilian B. MELLO \*\*\*

RIALA6/549

CHIEFFI, P.P.; PAES, R.A.P.; UEDA, M.; NAKAMURA, P.M. & MELLO, L. de B.  
— Anticorpos circulantes antinervo periférico na esquistossomose mansônica.  
*Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):67-70, 1982.

**RESUMO:** Procurou-se determinar a existência de anticorpos antinervo periférico no soro de 35 pacientes comprovadamente infectados por *Schistosoma mansoni*, através de reação de imunofluorescência indireta em cortes de nervo ciático de camundongo. Como controles, utilizaram-se os soros de 30 pacientes com sorologia positiva para tripanosomíase americana, 30 pacientes com reações sorológicas positivas para toxoplasmose, 30 pacientes com sorologia positiva para lues, além de 20 soros de indivíduos negativos para todas estas entidades mórbidas, considerados como padrão de normalidade. Os resultados mostraram reações positivas em 83,3% dos soros de pacientes chagásicos, em 62,8% dos soros de pacientes esquistossomóticos, em 10% dos soros dos pacientes com reações sorológicas positivas para lues, em 6,6% dos soros de pacientes infectados por *Toxoplasma gondii* e em 20% dos soros considerados normais. Notou-se nitida diferença entre o padrão de reação ao se compararem os resultados obtidos nos soros de pacientes esquistossomóticos, com os verificados em pacientes chagásicos. No primeiro caso a fluorescência ocorreu ao redor dos axônios, na maioria das vezes e, no caso de pacientes chagásicos, em torno da bainha das células de Schwann. Tais achados sugerem que também na esquistossomose mansônica formam-se anticorpos antinervo periférico, como já fora demonstrado anteriormente para a tripanosomíase americana.

**DESCRIPTORIOS:** esquistossomose mansônica; anticorpos antinervo periférico na esquistossomose mansônica.

### INTRODUÇÃO

Em 1974, COSSIO *et alii*<sup>1,2</sup> descreveram, em pacientes chagásicos, a presença de anticorpos que reagem contra estruturas vasculares, endoteliais e intersticiais de tecidos de camundongos, denominando-os anticorpos EVI. Posteriormente, KHOURY *et alii*<sup>4</sup> insistiram na importância deste achado em relação ao valor

diagnóstico na infecção por *Trypanosoma cruzi*.

Observações de PAES *et alii*<sup>7</sup>, em pacientes com esquistossomose mansônica, mostraram, todavia, pouca diferença com relação ao padrão de reação verificado em pacientes chagásicos, lançando dúvidas sobre a especificidade dos anticorpos EVI.

\* Realizado no Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP.

\*\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

Recentemente, descreveu-se a ocorrência de imunoglobulinas séricas, associadas à presença de anticorpos EVI e infecção chagásica, que reagem com nervos periféricos, autonômicos e somáticos, atribuindo-se relevância a este achado como mecanismo fisiopatológico na cardiomiopatia chagásica<sup>5</sup>. Tal assertiva foi confirmada por PERALTA *et alii*<sup>8</sup> que, entretanto, não conseguiram relacionar a presença destes anticorpos — EVI e antinervo — com maior severidade no quadro clínico da doença de Chagas.

No presente trabalho procura-se pesquisar a ocorrência de anticorpos antinervo periférico no soro de pacientes com infecção esquistossomótica, comparando os resultados com os padrões verificados em soros de pacientes com infecção chagásica além de pacientes com reações sorológicas positivas para lues e toxoplasmose.

### MATERIAL E MÉTODOS

Estudaram-se cinco grupos de soros:

- a) 35 soros de pacientes com esquistossomose mansônica, confirmada por exames parasitológicos de fezes;
- b) 30 soros de pacientes encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz, com sorologia positiva para infecção chagásica, através de reações de fixação de complemento, imunofluorescência indireta e hemaglutinação passiva;
- c) 30 soros de pacientes encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz com reações de floculação (V.D.R.L.), fixação de complemento e hemaglutinação passiva para sífilis positivas;
- d) 30 soros de pacientes encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz apresentando reação de imunofluorescência indireta para toxoplasmose com título igual ou superior a 1:1024;
- e) 20 soros de pacientes encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz, com exame de fezes negativo para esquistossomose e sorologia negativa para tripanosomíase americana, toxoplasmose e sífilis.

A reação de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos antinervo foi executada empregando-se a técnica descrita

por JOHNSON & HOLBOROW<sup>3</sup>, em cortes não fixados de nervo ciático de camundongo, de 4 micrômetros de espessura, obtidos em criostatado. Na execução da reação, os soros dos pacientes foram diluídos a 1:10. A demonstração de anticorpos antinervo foi feita através de soro de carneiro anti-globulina total humana, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (Institut Pasteur, Paris). A leitura da reação foi realizada com microscópio Zeiss com epiiluminação, munido de lâmpada de halogênio de 100 watts e 12 volts, com filtros excitador FITC e barreira BG53.

### RESULTADOS

Os cinco grupos de soros comportaram-se diferentemente quanto à fluorescência e intensidade de coloração observadas.

Entre os 35 soros de pacientes comprovadamente esquistossomóticos, 22 (62,8%) apresentaram fluorescência positiva na região do axônio, padrão facilmente distinguível daquele observado na periferia da bainha de mielina. Destes 22 soros, seis apresentaram fluorescência na região da bainha de mielina também, porém a intensidade de coloração foi sempre mais fraca do que a verificada nos soros de chagásicos.

Dos 30 soros de pacientes com sorologia positiva para tripanosomíase americana, 25 (83,3%) apresentaram fluorescência evidente em forma anelar, circundando a região periférica da bainha mielínica, com forte intensidade de reação, em sua maioria.

Três (10%) entre os 30 soros com sorologia positiva para sífilis apresentaram débil fluorescência na região do axônio. Entre os 30 soros com sorologia positiva para toxoplasmose, em apenas 2 (6,6%) ocorreu fluorescência ao redor dos axônios; todavia, em sete casos (23,3%) encontrou-se fluorescência débil na área correspondente à bainha de mielina.

Nos 20 soros considerados normais observou-se fluorescência em quatro ocasiões (20%), sempre ao redor dos axônios.

Na tabela abaixo, resumem-se os resultados.

TABELA

*Padrão de fluorescência antinervo periférico observada em soros de pacientes com esquistossomose mansônica, tripanosomíase americana, toxoplasmose e lues, comparada com grupo-controle*

Pacientes Examinados		Reação Positiva			
		Axônio		Bainha	
Infecção	N.º	N.º	%	N.º	%
Esquistossomose	35	22	62,8	6	5,7
Tripanosomíase	30	—	—	25	83,3
Lues	30	3	10,0	—	—
Toxoplasmose	30	2	6,6	7	23,3
Normais	20	4	20,0	—	—

## DISCUSSÃO

Nossos resultados indicam que é freqüente a ocorrência de anticorpos antinervo periférico no soro de pacientes infectados pelo *Schistosoma mansoni*. Entretanto, há nítida diferença entre o padrão de reação que ocorre nos soros de pacientes chagásicos, nos quais se verifica fluorescência ao redor da bainha das células de Schwann e o encontrado no soro de pacientes esquistossomóticos. Nestes, em sua maioria, a reação ocorre em torno dos axônios. Este também é o caso, em proporção bem menor, dos pacientes com reação sorológica positiva para lues e do grupo considerado normal.

É possível que tais resultados traduzam diferenças biológicas entre as imunoglobulinas antinervo periférico que surgem no soro de

pacientes com tripanosomíase americana e esquistossomose. No primeiro caso, tem-se atribuído importância a estas imunoglobulinas como fator etiopatogênico na ocorrência de desnervação autonômica que poderia explicar a gênese de lesões características da doença de Chagas<sup>5</sup>. Contudo, a presença de anticorpos antinervo periférico em 62,8% dos soros de pacientes esquistossomóticos examinados neste trabalho, ainda que apresentando padrão diferente de reatividade, suscita dúvidas sobre a especificidade destas imunoglobulinas.

Dúvida semelhante já fora aventada com relação à especificidade e papel fisiopatológico dos anticorpos EVI por PAES *et alii*<sup>7</sup>, em trabalho já comentado, e por LENZI *et alii*<sup>8</sup> que mostraram a produção experimental de fator EVI em coelhos inoculados com antígenos solúveis, obtidos a partir de coração e músculo esquelético de camundongos.

RIAL6/549

CHIEFFI, P.P.; PAES, R.A.P.; UEDA, M.; NAKAMURA, P.M. & MELLO, L.B. — Anti-peripheral nerve antibodies in the blood of patients with Manson's schistosomiasis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):67-70, 1982.

**ABSTRACT:** Indirect immunofluorescence tests were made on cryostat sections of mouse sciatic nerve for detection of circulating antibodies against this nerve tissue. Control groups included 30 sera from individuals with positive serology for American trypanosomiasis, 30 sera positive for toxoplasmosis, 30 sera positive for syphilis and 20 sera negative for any of the control diseases. Positive staining was observed in 83.3% of sera from chagasic patients, 62.8% of sera from patients with Manson's schistosomiasis, 10.0% of sera positive for syphilis, 6.6% of sera from patients infected with *Toxoplasma gondii* as well as in 20.0% of the normal controls. A clear-cut difference was observed when sera from patients with Manson's schistosomiasis were compared with sera from patients infected by *Trypanosoma cruzi*. The majority of positive sera from patients with schistosomiasis displayed a fluorescent staining around the axons, while chagasic anti-nerve antibodies showed a bright staining located on Schwann's sheaths. These findings suggest that, in Manson's schistosomiasis, there is induction of antibodies against mouse peripheral-nerve tissue which is similar to the induction found in American trypanosomiasis.

**DESCRIPTORS:** Manson's schistosomiasis; antibodies, anti-peripheral antibodies in Manson's schistosomiasis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COSSIO, P.M.; DIEZ, C.; SZARFMAN, A.; KREUTZER, E.; CANDIOLO, B. & ARANA, R.M. — Chagasic cardiopathy. Demonsstration of a serum gammaglobulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, 49:13-21, 1974.
2. COSSIO, P.M.; LAGUENS, R.P.; DIEZ, C.; SZARFMAN, A.; SEGAL, A. & ARANA, R.M. — Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation*, 50:1252-9, 1974.
3. JOHNSON, G.D. & HOLBOROW, E.J. — Immunofluorescence. In: WEIR, D.M., ed. — *Handbook of experimental immunology*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford, Blackwell, 1973. p. 18.1-18.20.

CHIEFFI, P.P.; PAES, R.A.P.; UEDA, M.; NAKAMURA, P.M. & MELLO, L.B. — Anticorpos circulantes antinervo periférico na esquistossomose mansônica. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):67-70, 1982.

---

4. KHOURY, E.L.; COSSIO, P.M.; SZARFMAN, A.; MARCOS, J.C.; MORTEO, O.G. & ARANA, R.M. — Immunofluorescent vascular pattern due to EVI antibody of Chagas' disease. *Am. J. clin. Path.*, 69: 62-5, 1978.
5. KHOURY, E.L.; RITACCO, V.; COSSIO, P.M.; LAGUENS, R.; SZARFMAN, A.; DIEZ, C. & ARANA, R.M. — Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. exp. Immunol.*, 36:8-15, 1979.
6. LENZI, J.G.A.; LENZI, H.L. & ANDRADE, Z.A. — Produção experimental do fator EVI. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 15.º Campinas, 1979. *Resumos*.
7. PAES, R.A.P.; UEDA, M. & GORDINHO, R.S. — Anticorpos anti-reticulina em esquistossomose crônica. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39:121-5, 1979.
8. PERALTA, J.M.; GINEFRA, P.; DIAS, J.C.P.; MAGALHÃES, J.M.S. & SZARFMAN, A. — Autoantibodies and chronic Chagas' disease. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hkg*, 75:568-9, 1981.

*Recebido para publicação em 4 de maio de 1982.*

## PARTÍCULAS VIRAIS EM CULTURA DE CÉLULAS BHK-21: ULTRAESTRUTURA, OCORRÊNCIA E SIGNIFICADO \*

Marli UEDA \*\*  
Hatune TANAKA \*\*  
Dalton R. WEIGL \*\*  
Paulo P. JOAZEIRO \*\*

RIALA6/550

UEDA, M.; TANAKA, H.; WEIGL, D.R. & JOAZEIRO, P.P. — Partículas virais em cultura de células BHK-21: ultraestrutura, ocorrência e significado. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):71-75, 1982.

**RESUMO:** Em culturas de células BHK-21, são descritas partículas semelhantes a vírus, cuja morfologia característica corresponde às "partículas R" constantes da literatura internacional. Por meio de fotomicrografias eletrônicas, são documentados a formação dessas partículas por brotamento nas membranas do retículo endoplasmático, bem como, detalhes da sua ultraestrutura.

**DESCRIPTORIOS:** vírus; "partícula R", detecção, ultraestrutura; célula BHK-21, cultura; microscopia eletrônica.

### INTRODUÇÃO

Células BHK-21, ou seja, fibroblastos de rim de hamster recém-nascidos são amplamente utilizadas em virologia.

No curso de observações realizadas na Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, em células BHK-21 experimentalmente inoculadas em vários laboratórios, que trabalham na área de virologia, freqüentemente eram detectadas partículas semelhantes a vírus, cuja morfologia não correspondia ao vírus objeto da pesquisa. A ocorrência destas partículas nas amostras examinadas determinou cuidados especiais por parte dos autores, no sentido de conhecer sobre a ocorrência, estrutura e aspectos da formação destas partículas, a fim de que pudessem operar livres de erros que viessem comprometer os trabalhos em andamento.

A realização do presente trabalho tem como objetivo fornecer elementos que possam servir de auxílio, em nosso meio, aos estudos que são realizados em laboratórios que utilizam culturas celulares.

### MATERIAL E MÉTODOS

Culturas de células BHK-21, em meio Eagle, fornecidas pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, tiveram sua monocamada raspada cuidadosamente da superfície por bastão de vidro com coifa de borracha em uma das pontas. Foram, então, submetidas a baixa centrifugação durante 10 minutos. O sedimento desta operação foi mantido em geladeira durante 4 horas numa solução fixadora (PH 7.2, 360 mOsm/l) de glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio. Em seguida, o sedimento foi submetido, durante 40 minutos, a um processo de pós-fixação pelo ácido ósmico a 1% em tampão cacodilato, tendo sido mantidas as mesmas condições de temperatura, pH e osmolaridade.

Após lavagem, o material permaneceu durante 12 horas em solução de acetato de uranila a 0,5%, tendo sido então processada a inclusão em resina Polylyte (WEIGL & KISIELIUS<sup>10</sup>), de acordo com as técnicas de preparação para microscopia eletrônica.

\* Realizado na Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

Os cortes ultrafinos, obtidos em micrótomo\* de avanço mecânico, usando-se navalhas de vidro, foram colhidos em grades previamente recobertas por Formvar e corados por acetato de uranila e citrato de chumbo<sup>7</sup>. Foram examinados e documentados, utilizando-se microscópios eletrônicos\*\* operando a 60 kV.

## RESULTADOS

As observações documentadas através da microscopia eletrônica revelam a presença de partículas semelhantes a vírus, esféricas, apresentando um diâmetro de cerca de 80 nm. O *core* central, com diâmetro de aproximadamente 37 nm, revela-se sempre elétron-denso e envolto por uma camada elétron-transparente, delimitada por uma nítida membrana envoltória. Entre o *core* da partícula e a membrana delimitante são observadas finas estruturas que cruzam a camada elétron-transparente, dando ao conjunto um aspecto radial (fig. 1).

As partículas, ora em grupos ora isoladas, não foram detectadas em todas as células de uma mesma cultura. Quando presentes, localizavam-se na luz de cisternas do retículo endoplasmático (RE), tendo sido muitas vezes documentados, nas observações realizadas, aspectos de um processo característico de sua formação, qual seja, por brotamento para a luz do RE (fig. 2 e 3). Notou-se, também, um aumento exagerado no espaço perinuclear o qual, freqüentemente, é ocupado por inúmeras partículas (fig. 4).

Não foi constatado qualquer indício de processo de brotamento na membrana citoplasmática da célula, isto é, brotamento para fora da célula. Também não foram observadas, nas inúmeras inclusões realizadas, partículas virais na matriz citoplasmática, bem como não houve evidências morfológicas que sugerissem o envolvimento do núcleo na formação das partículas.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

BERNHARD & TOURNIER<sup>2</sup> foram os primeiros a descrever partículas semelhantes a vírus que causam infecções inaparentes nas culturas de células BHK-21. SHIPMAN *et alii*<sup>3</sup>, nestas mesmas linhagens de células, descreveram partículas semelhantes e denominaram-nas "partículas R" devido ao aspecto radial característico do *core* dessas partículas. DE HARVEN<sup>4</sup> descreveu, também, a "partícula R" em culturas de células BHK-21.

ROSSIGNOL *et alii*<sup>5</sup> estudaram a atividade bioquímica associada à "partícula R" em cultura de células de hamster, enquanto BERGMANN & WOLFF<sup>1</sup> estudaram a ação de drogas induzindo a formação de "partículas R" em BHK-

21 clone-F. A atividade bioquímica desta partícula foi muito explorada por vários autores, atribuindo-lhe alguns um caráter oncogênico em hamster.

A ocorrência de partículas contaminantes é fenômeno freqüente nas culturas celulares e geralmente, tratando-se de infecções inaparentes, isto é, sem manifestações de efeitos citopáticos, somente é detectável através da microscopia eletrônica.

No laboratório de microscopia eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, preparações inoculadas de BHK-21, inoculadas tanto com o vírus Rocio como com o vírus da rubéola, mostraram que "partículas R" e os vírus em questão coexistem perfeitamente, diferenciando-se pelos seus caracteres morfológicos, nada sugerindo qualquer inibição, interação ou interferência. Entretanto, outras culturas de BHK-21, inoculadas com vírus da coriomeningite linfocitária, apresentaram somente "partículas R", não sendo possível inferir, já que as observações se basearam apenas em dados morfológicos, um provável fenômeno de inibição.

Os resultados obtidos neste trabalho coincidem com os de MURPHY *et alii*<sup>5</sup> e CROMACK<sup>3</sup>. O primeiro, trabalhou com células BHK inoculadas com o vírus da rubéola, enquanto que o segundo, trabalhando com um arbovírus (WEE), utilizou cultura de células de embrião de galinha; nestas, ocorrem partículas virais distintas das "partículas R" por apresentarem formação por brotamento da membrana citoplasmática, ou seja, para fora da célula.

As partículas virais presentes nas observações ultraestruturais apresentadas neste trabalho, e apontadas nas figuras que ilustram o mesmo, são semelhantes às descritas pela literatura citada.

A ocorrência de células que não apresentam "partícula R", entre células altamente infectadas, não pôde ser explicada, uma vez que, entre outras razões, foram levadas em consideração a aleatoriedade do plano de corte ou possíveis diferenças existentes entre células de uma mesma cultura.

A presença das "partículas R" em culturas de células BHK-21 é problema internacional e parece escapar aos cuidados na cultura celular, uma vez que o vírus deve estar ligado a fatores genéticos da própria célula.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela complementação salarial concedida a Hatune Tanaka para a realização de parte deste trabalho. À Seção de Fotomicrografia do Instituto Adolfo Lutz, pelos serviços prestados.

\* Servall, mod. Porter-Blum.

\*\* Philips EM-200 e EM-400.





FIGURA 1 — A seta indica “partícula R” com morfologia característica. Finas estruturas radiais cruzam a camada elétron-transparente, entre o *core* da partícula e a membrana delimitante. N = núcleo.

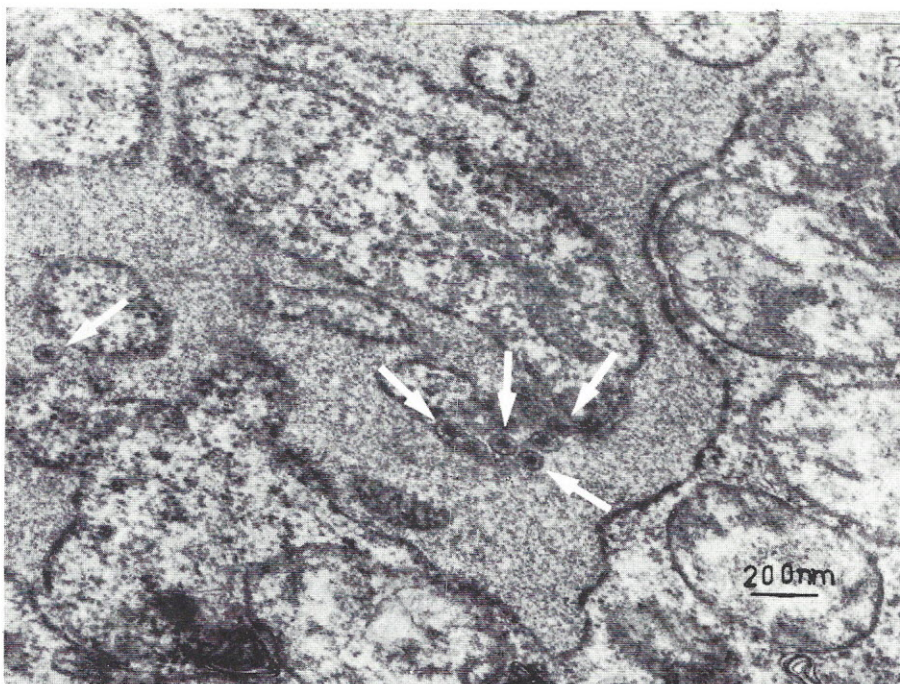


FIGURA 2 — Fotomicrografia eletrônica de célula BHK-21. As setas mostram grupo de “partículas R” em cisterna do retículo endoplasmático.

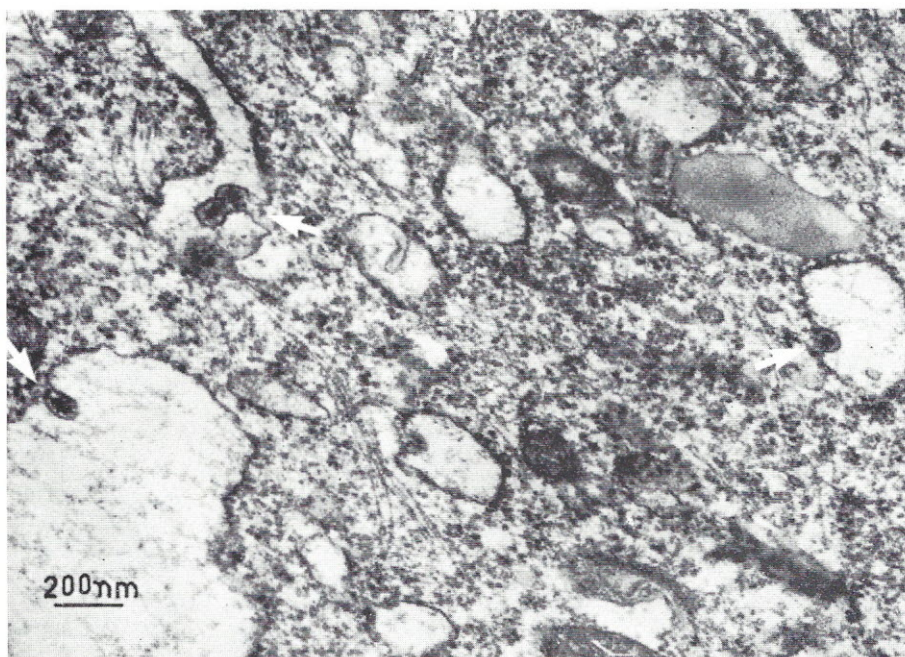


FIGURA 3 — Fotomicrografia eletrônica de célula BHK-21, cujas setas apontam "partículas R" em brotamento para o interior das cisternas de retículo endoplasmático.

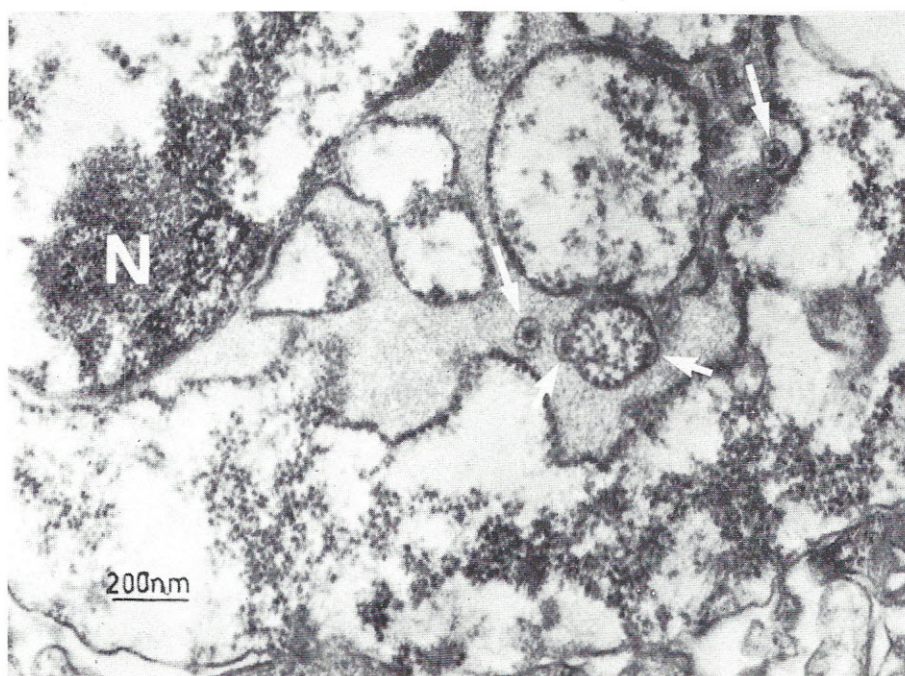


FIGURA 4 — Fotomicrografia eletrônica de partículas R" no espaço perinuclear. N = núcleo.

RIALAG/550

UEDA, M.; TANAKA, H.; WEIGL, D.R. & JOAZEIRO, P.P. — Ultrastructure, occurrence and interpretation of virus-like particles in BHK-21 cells. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):71-75, 1982.

ABSTRACT: Electron microscopy of cultures of BHK-21 cells disclosed virus-like particles resembling the "R" particles observed by other authors. Particles seemingly originated through budding of the endoplasmic reticulum membrane. Fully grown particles were usually found in the lumen of the endoplasmic reticulum or in the perinuclear space.

DESCRIPTORS: virus-like particle; R-type virus-like particle, detection, structure; cell, BHK-21, culture; electron microscopy.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERGMANN, D.G. & WOLFF, D.A. — Production of R-type virus-like particles in hamster cells. *Intervirology*, 16:61-70, 1981.
2. BERNHARD, W. & TOURNIER, P. — Infection virale inapparente de cellules de hamsters décelée par la microscopie électronique. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 107: 447-51, 1964.
3. CROMACK, A.S. — An electron microscope study of virus-like particles in chick embryo and L cells cultures. *J. gen. virol.*, 2:195-8, 1968.
4. DE HARVEN, E. — Identification of tissue culture contaminants by electron microscopy. In: FOGH, J., ed. — *Contamination in tissue culture*. New York, Academic Press, 1973. p. 205-31.
5. MURPHY, F.A.; HALONEN, P.E. & HARRISON, A.K. — Electron microscopy of development of Rubella virus in BHK-21 cells. *J. Virol.*, 2:1223-7, 1968.
6. MUSSGAY, M.; RECZKO, E. & AHL, R. — Demonstration of virus-like particles in a bovine cell line. *J. gen. Virol.*, 4:445-7, 1969.
7. REYNOLDS, E.S. — The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17: 208-12, 1963.
8. ROSSIGNOL, J.M.; KRESS, M. & RECONDO, A.M. — Reverse transcriptase activity associated with R-type virus-like particles of SV 40 — transformed hamster cells (TSV<sub>5</sub> clone 2). *Intervirology*, 5: 273-92, 1975.
9. SHIPMAN, C.J.; VANDER WEIDE, G.C. & ILMA, B. — Prevalence of type R virus-like particles in clones of BHK-21 cells. *Virology*, 38:707-10, 1969.
10. WEIGL, D.R. & KISIELIUS, J.J. — A resina Polylyte na microscopia eletrônica. *Cienc. Cult.*, São Paulo, 24(6, supl.): 212, 1972.

Recebido para publicação em 4 de maio de 1982.



ÍNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX

BARRETTO, H.H.C., 45  
CAMARGO, E.D., 27  
CHIEFFI, P.P., 59, 63, 67  
GARRIDO, N.S., 21  
GELLI, D.S., 9  
GOMES, veja SALLES GOMES  
GORDINHO, R.S., 63  
INOMATA, E.I., 39  
INOMATA, O.N.K., 45  
JOAZEIRO, P.P., 71  
LAMARDO, L.C.A., 39  
LARA, W.H., 35, 45, 53  
MELLES, C.E.A., 1  
MELLES, H.H.B., 17  
MELLO, L.B., 67  
MURATA, L.T.F., 21  
NAKAMURA, P.M., 63, 67  
NASCIMENTO, E., 59  
PAES, 63, 67  
PIRES, R.B.R., 1  
PREGNOLATTO, N.P., 21  
SABINO, M., 39  
SAKUMA, A.M., 35  
SAKUMA, M.E., 27  
SALLES GOMES, L.F., 27  
SALLES GOMES JR., C.E., 27  
SEMENTILLI, A., 27  
TAKAHASHI, M.Y., 53  
TAKEDA, A.K., 1  
TAKIMOTO, S., 17  
TANAKA, H., 71  
TAUNAY, A.E., 1  
UEDA, M., 71  
UEDA, M., 63, 67  
WEIGL, D.R., 71  
YABIKU, H.Y., 35



## ÍNDICE DE ASSUNTO

- Aflatoxina B<sub>1</sub>  
em paçoca, determinação  
cromatografia em camada delgada, 39  
em pasta de amendoim, determinação  
cromatografia em camada delgada, 39
- Alimentos  
embalagens, análise, 21
- Alimentos infantis, análise  
chumbo, determinação, 35
- Amendoim, paçoca  
aflatoxina B<sub>1</sub>, determinação, 39
- Amendoim, pasta  
aflatoxina B<sub>1</sub>, determinação, 39
- Anticorpos  
anticorpos antinervo periférico  
na esquistossomose mansônica, 67  
anticorpos anti-reticulina  
na esquistossomose mansônica, 63
- Camundongos albinos  
infecção experimental por *Schistosoma  
mansoni*  
anticorpos anti-reticulina no soro, fre-  
quência, 63  
infecção crônica por *Toxoplasma gondii*  
resposta ao pentetrazol, 59
- Células, cultura  
Célula BHK-21  
partícula R, detecção  
microscopia eletrônica, 71
- Chumbo  
em alimentos infantis, determinação  
espectrofotometria de absorção atômica,  
35
- Embalagens  
embalagens metálicas para alimentos, análise,  
21  
embalagens plásticas para alimentos, análise,  
21
- Encefalite herpética  
diagnóstico histológico, 27
- Esquistossomose mansônica, 63, 67
- Herpesvirus hominis*, tipo 1  
isolamento do cérebro e do sangue, 27
- Hortaliças frescas  
nitrito, determinação, 53
- Infecções por Orthomyxovirus  
vírus da influenza, tipo C, 17
- Influenza  
vírus da influenza, tipo C  
anticorpos em soro humano, frequência  
habitantes da cidade de São Paulo, 17
- Leite humano, análise  
resíduos de pesticidas organoclorados, detecção,  
45
- Meningite pneumocócica  
imunodiagnóstico, 1
- Nitrato  
em hortaliças frescas, determinação 53
- Orthomyxovirus, infecções  
veja Infecções por Orthomyxovirus
- Paçoca  
veja Amendoim, paçoca
- Partícula R  
veja Vírus
- Pesticidas organoclorados (resíduos), determinação em leite humano  
cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons, 45
- Plásticos  
embalagens para alimentos, análise, 21
- Streptococcus pneumoniae*  
no líquido cefalorraquidiano  
identificação dos sorotipos  
contraimunoeletroforese, 1
- Toxoplasmose  
camundongos albinos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii*  
resposta ao pentetrazol, 59
- Vírus  
Partícula R  
em células BHK-21, detecção, 71  
ultraestrutura, 71
- Yersinia enterocolitica*  
crescimento, termo-resistência em diversos substratos  
pH, temperatura, 9





## SUBJECT INDEX

- Aflatoxin B<sub>1</sub>  
in peanut *paçoca* (sweet bar), determination  
thin-layer chromatography, 39  
in peanut paste, determination  
thin-layer chromatography, 39
- Antibodies  
anti-peripheral nerve antibodies  
in Manson's schistosomiasis, 67  
anti-reticulin antibodies  
in Manson's schistosomiasis, 63
- Baby foods, analysis  
lead, determination, 35
- Cells, cultured  
BHK-21 cell  
R-type virus-like particle, detection  
electron microscopy, 71
- Containers  
food container, metallic, analysis, 21  
food container, plastic, analysis, 21
- Encephalitis, herpetic  
histologic diagnosis, 27
- Food  
baby foods, analysis, 35  
food containers, analysis, 21
- Herpesvirus hominis*, type 1  
isolation from brain and blood, 27
- Influenza  
C-type influenza virus  
antibodies in human sera  
from inhabitants in São Paulo City, 17
- Lead  
in baby foods, determination  
atomic-absorption spectrophotometry, 35
- Meningitis, pneumococcal  
immunodiagnosis, 1
- Mice  
white mice  
experimental infection with *S. Mansoni*  
anti-reticulin antibodies in sera,  
frequency, 63  
chronic infection with *Toxoplasma gondii*  
response to pentetrazol, 59
- Milk, human, analysis  
organochlorine pesticide residues, 45
- Nitrate  
in fresh vegetables, determination, 53
- Orthomyxovirus infection  
C-type influenza virus, 17
- Peanut, *paçoca* (sweet bar)  
aflatoxin B<sub>1</sub>, determination, 39
- Peanut, paste  
aflatoxin B<sub>1</sub> determination, 39
- Pesticides  
organochlorine pesticide residues  
in milk, detection  
electron capture gas-liquid chromatography, 45
- Plastics  
for food containers, analysis, 21
- R-type virus-like particle  
see virus
- Schistosomiasis  
Manson's schistosomiasis, 63, 67
- Streptococcus pneumoniae*  
in the spinal fluid  
serotype identification  
counter-current immunoelectrophoresis, 1
- Toxoplasmosis  
white mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*  
response to pentetrazol, 59
- Vegetables, fresh  
nitrate determination, 53
- Virus-like particle  
R-type virus-like particle  
in BHK-21 cells, detection, 71  
ultrastructure, 71
- Yersinia enterocolitica*, serotype 0<sub>3</sub>  
growth, thermo-resistance in some substrates  
pH, temperature, 9