

## EVIDENCIAÇÃO DE VÍRUS PATOGÊNICOS HUMANOS EM FILÉS DE PEIXE

Ary Walter Schmid\*  
Klaus E. Stewien\*  
J. A. N. Candeias\*

RSPU-B/372

SCHMID, A. W. et al. *Evidenciação de vírus patogênicos humanos em filés de peixe.* Rev. Saúde públ., S. Paulo, 11:405-9, 1977.

**RESUMO:** Foi desenvolvido método para a evidenciação de vírus em filés de peixe. Amostras de 50 gramas foram submetidas à agitação mecânica durante 5 min em 200 ml de água bidestilada esterilizada, em pH 7,3-7,5. As substâncias em suspensão foram removidas mediante uma filtração de clarificação. A suspensão clarificada foi em seguida submetida à ultrafiltração através de membrana de alginato de sódio, sendo esta posteriormente dissolvida em 2 ml de citrato de sódio a 3,8%. A suspensão obtida foi, a seguir, centrifugada a 10.000 rpm durante 20 min, a 4°C, adicionando-se ao sobrenadante penicilina, estreptomicina e anfotericina B. O isolamento de vírus foi feito em culturas primárias de células de rim de macaco rhesus, células HeLa e por inoculação em camundongos recém-nascidos. A identificação sorológica levou aos seguintes resultados: de 51 filés de peixe foram isoladas duas estirpes de poliovírus tipo 1, duas de poliovírus tipo 3 e uma de coxsackievírus B4, o que corresponde a uma percentagem de positividade de 9,8%. A identificação intratípica das quatro estirpes de poliovírus isoladas revelou ser uma delas semelhante e as demais diferentes das estirpes vacinais.

**UNITERMOS:** *Vírus patogênicos humanos. Vírus, cultura.*

### I N T R O D U Ç Ã O

Grande número de informações disponíveis sobre a possibilidade dos alimentos poderem veicular determinados vírus e, eventualmente, transmitir doenças de etiologia viral, pode ser encontrado em estudos epidemiológicos<sup>1,2,3</sup>. Com o aperfeiçoamento das técnicas de concentração, começam a acumular-se dados adicionais sobre a ocorrência de vírus patogênicos em alimentos<sup>4,5,7,8,10</sup>. Com base nos estudos epidemiológicos e laboratoriais, constata-se que os vírus entéricos estão frequentemente asso-

ciados a alimentos, havendo mesmo evidências de relação causa-efeito entre a ingestão de alimentos e surtos de poliomielite. Esta observação, feita por Cliver<sup>3</sup>, em 1969, tem particular interesse não só em termos dos poliovírus, mas como ilustração do modo como outros enterovírus poderão disseminar-se, tendo como veículo os alimentos, dadas as semelhanças epidemiológicas comuns a estes.

As membranas solúveis de alginato de sódio, descritas por Gärtner<sup>6</sup>, oferecem efi-

\* Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP — "Setor Saúde Pública" — Av. Dr. Arnaldo, 715 — 01255 — São Paulo, SP — Brasil.

ciência de recuperação para enterovírus que pode variar entre 70 e 100%<sup>9</sup>, apresentando a vantagem de sua solubilização ser feita em pH próximo da neutralidade, com o que se contorna a possibilidade de inativação dos vírus sensíveis a variações amplas do pH<sup>12,17</sup>.

O objetivo do presente trabalho é o isolamento e identificação de vírus de determinado tipo de alimento — filés de peixe — usando-se filtros de alginato solúvel, após tratamento do material em estudo segundo técnica determinada.

#### MATERIAL E MÉTODOS

##### *Filés de peixe*

Foram examinados 51 filés de pescada, de 50 gramas, adquiridos em peixarias, mercados, feiras livres e supermercados do Município de São Paulo, de outubro de 1975 a outubro de 1976. Comprava-se o peixe na qualidade de consumidor comum e mandava-se preparar os filés no ato. Os peixes eram cortados e manipulados pelo vendedor sem maiores precauções de higiene, e geralmente não eram lavados. Em seguida, transportava-se o material diretamente para o laboratório, onde era guardado em geladeira a 4°C até ser examinado. Os exames eram realizados logo em seguida ou no máximo dentro de 24 horas.

##### *Método de concentração de vírus*

Depois de pesados, os filés de peixe eram colocados em um Erlenmeyer, juntando-se 200 ml de água bidestilada esterilizada. Para facilitar a eluição dos vírus eventualmente presentes, o meio era alcalinizado com solução de hidróxido de sódio 0,1 N até se obter pH de 7,3 a 7,5. O material era agitado vigorosamente durante 5 min, removendo-se em seguida as substâncias em suspensão por meio de filtração em filtro de fibra de vidro (AP-20, Millipore Co.). A suspensão clarificada era então subme-

tida a ultrafiltração através de membrana de alginato de sódio (SM 127 10, Sartorius GmbH); esta membrana era dissolvida, após a filtração, em citrato de sódio a 3,8%. Em seguida, centrifugava-se o material a 10.000 rpm por 20 min a 4°C e adicionava-se ao sobrenadante penicilina, estreptomicina e anfotericina B nas concentrações finais de, respectivamente, 2.000 U, 2.000 µg e 1 µg por ml. As provas de esterilidade eram realizadas em meios de tioglicolato e Sabouraud.

##### *Culturas de células*

Para o isolamento dos vírus foram utilizadas culturas de células primárias de rim de macaco rhesus (Flow Laboratories, E. U. A.) e células da linhagem HeLa. O meio de Eagle MEM adicionado de antibióticos nas concentrações usuais e contendo 2% de soro fetal bovino serviu de meio de manutenção para as culturas preparadas.

##### *Isolamento e identificação dos vírus*

As suspensões concentradas de filés de peixe foram inoculadas nas culturas de células renais de macaco rhesus e de HeLa em quantidades de 0,1 ml, e por via subcutânea em camundongos recém-nascidos em quantidades de 0,03 ml. Para cada suspensão utilizaram-se 5 tubos de cada tipo de célula e lotes de 5 camundongos. As culturas eram acompanhadas durante 15 dias e os camundongos ficavam em observação até 3 semanas. A identificação dos enterovírus isolados foi feita mediante provas de neutralização, utilizando misturas de soros hiperimunes, segundo o esquema de Lim & Benyesh-Melnick<sup>11</sup>.

##### *Identificação intratípica de poliovírus*

Esta foi realizada pelo método da comparação dos índices de neutralização segundo a microtécnica<sup>14,15,16</sup>. Adotou-se o critério de Plotkin e col.<sup>13</sup> para a identificação das estirpes de vírus.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alguns comentários são necessários a respeito das dificuldades iniciais encontradas. A ultrafiltração direta das suspensões de filés de peixe mostrou-se inviável devido à presença de numerosos fragmentos tissulares, provocando a obstrução das membranas de alginato de sódio. A remoção das partículas grosseiras em suspensão foi insuficiente quando o material era centrifugado a 5.000 ou 10.000 rpm durante 15 a 30 min. Foi possível eliminar os fragmentos e as partículas em suspensão mediante uma filtração rápida, com pressão positiva, através de membrana de fibra de vidro (AP-20), com obtenção de um filtrado claro e transparente, técnica que, segundo observações anteriores<sup>18</sup>, só elimina 2 a 5% do total de vírus presentes. Os filtrados assim obtidos passavam facilmente através de ultrafiltros de alginato de sódio (SM 127 10). O volume inicial de 200 ml de suspensão foi processado, em média, em 15

min, dando um volume final de cerca de 100 ml, utilizando-se uma pressão de 4 a 5 atmosferas. A duração total do processamento de cada amostra de peixe não costumava ultrapassar uma hora.

Os resultados do isolamento são apresentados na Tabela abaixo; como se verifica, foram evidenciados enterovírus em 5 dos 51 filés de peixe examinados, do que resulta uma taxa de positividade de 9,8%. As amostras de poliovírus foram isoladas em culturas de células de rim de macaco e o coxsackievírus, em camundongos. A identificação intratípica revelou que as duas amostras de poliovírus do tipo 1 eram heterólogas à estirpe LSc 2ab de vacina Sabin, e das duas do tipo 3 uma foi heteróloga e a outra isóloga à estirpe atenuada de Sabin Leon 12 a<sub>1</sub>b. É interessante observar que a estirpe isóloga foi isolada cerca de um mês após a vacinação em massa contra a poliomielite no Município de São Paulo, realizada em outubro de 1975.

T A B E L A

Vírus isolados de filés de peixe adquiridos no Município de São Paulo  
(outubro 1975 - outubro 1976)

Origem	Nº de amostras examinadas	Vírus identificados
Peixarias	30	2 Poliovírus tipo 1 1 Coxsackievírus B4
Mercados	10	1 Poliovírus tipo 3
Feiras livres	9	---
Supermercados	2	1 Poliovírus tipo 3 (Sabin)
Total	51	

O presente trabalho não permite determinar a fonte de contaminação por vírus dos filés de peixe examinados. Contudo, o mais provável é que ela tenha ocorrido pela manipulação durante o preparo dos

filés. Os enterovírus isolados poderiam ser provenientes das mãos do próprio manipulador ou, eventualmente, do conteúdo intestinal do peixe. Observou-se que a faca do manipulador não entra em contacto com as

vísceras do peixe durante a preparação dos filés; assim, já deveria estar contaminada anteriormente em consequência da limpeza e evisceração de outros peixes. Esta possibilidade existe, sem dúvida, de vez que as facas e as mesas em que são preparados os peixes habitualmente não são lavadas e desinfetadas de modo conveniente. É nosso propósito verificar, em trabalhos futuros, a presença de vírus hu-

manos no conteúdo intestinal de peixes comumente utilizados na alimentação.

#### AGRADECIMENTO

Aos alunos da Disciplina "Enterovírus" do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela colaboração prestada.

RSPU-B/372

SCHMID, A. W. et al. [Detection of pathogenic virus in fish fillets]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 11:405-9, 1977.

**ABSTRACT:** *The purpose of this study was to develop a method for detection of virus in fish fillets. Samples (50g) of fish fillets were minced and shaken for 5 min with 200 ml of doubled distilled water (pH 7.3-7.5). The mixture was clarified by filtration. This food extract was subjected to filtration through a sterile sodium alginate membrane, which was thereafter dissolved in 2 ml of a 3.8% sodium citrate solution, and centrifuged at 10000 rev/min for 20 min, at 4°C. Penicillin, streptomycin and amphotericin B were added to the supernatant fraction. Virus isolations were done in primary rhesus (Macaca mulatta) monkey kidney cultures, HeLa cultures and newborn mice. Fifty one fish fillets were examined. The agents isolated were: 2 type 1 poliovirus, 2 type 3 poliovirus and one type B4 coxsackievirus, giving an isolation rate of 9.8%. Using the intratypic serodifferentiation for the characterization of the four polioviruses strains isolated from the fish fillets, only one was similar to the vaccine strain, and the three others were classified as non-vaccine like strains.*

**UNITERMS:** *Viruses, human pathogenic. Virus cultivation.*

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERG, G. The food vehicle in virus transmission. *Health Lab. Sci.*, 1:51-9, 1964.
2. CLIVER, D. O. Food associated viruses. *Health Lab. Sci.*, 4: 213-21, 1967.
3. CLIVER, D. O. Viral infections. In: RIE-MANN, H. ed. *Food-borne infections and intoxications*. New York, Academic Press, 1969. p. 73-113.
4. CLIVER, D. O. & GRINDROD, J. Surveillance methods for viruses in food. *J. Milk Food Technol.*, 32: 421-5, 1969.
5. CLIVER, D. O. & YEATMAN, J. Ultracentrifugation in the concentration and detection of enteroviruses. *Appl. Microbiol.*, 13: 387-92, 1965.
6. GARTNER, H. Retention and recovery of polioviruses on a soluble ultrafilter. In: BERG, G. *Transmission of viruses by the water route*. New York. John Wiley, 1965. p. 121-7.
7. HERRMANN, J. E. & CLIVER, D. O. Foodborne virus: detection in a model system. *Appl. Microbiol.*, 16:595-602. 1968.
8. HERRMANN, J. E. & CLIVER, D. O. Methods for detecting food-borne enteroviruses, *Appl. Microbiol.*, 16:1564-9, 1968.
9. HILL, W. F. et al. Detection of viruses in water: a review of methods and application. *Wat. Res.*, 5: 967-95, 1971.

---

SCHMID, A. W. et al. Evidenciação de virus patogênicos humanos em filés de peixe. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 11:405-9, 1977.

---

10. KOSTENBADER JR., K. D. & CLIVER, D. O. Filtration methods for recovering enteroviruses from foods. *Appl. Microbiol.*, 26:149-54, 1973.
11. LIM, K. A. & BENYESH-MELNICK, M. Typing of viruses by combinations of antiserum pools: application to typing of enteroviruses. *J. Immunol.*, 84: 309-17, 1960.
12. LYNT JR., R. K. Survival and recovery of enterovirus from foods. *Appl. Microbiol.*, 14: 218-22, 1966.
13. PLOTKIN, S. A. et al. Intratypic sero-differentiation of polioviruses. *Virology*, 15: 473-85, 1961.
14. STEWIEN, K. E. Identificação sorológica intratípica de poliovírus pelo método da comparação dos índices de neutralização. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 5: 243-61, 1971.
15. STEWIEN, K. E. & LACERDA, J. P. G. de. Aplicação do método da comparação dos índices de neutralização à identificação intratípica de poliovírus dos tipos 1 e 3, utilizando culturas de células Hep-2. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 9: 221-8, 1975.
16. STEWIEN, K. E. & LACERDA, J. P. G. de. Utilização da microtécnica para a identificação sorológica intratípica de estirpes de poliovírus dos tipos 1 e 3. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 11: 135-42, 1977.
17. TIERNEY, J. T. et al. Comparison of methods for the recovery of virus inoculated into ground beef. *Appl. Microbiol.*, 26: 497-501, 1973.
18. WALLIS, G. et al. Detection of viruses in large volumes of natural waters by concentration on insoluble polyelectrolytes. *Wat. Res.*, 4: 787-96, 1970.

*Recebido para publicação em 17/02/1977*

*Aprovado para publicação em 28/03/1977*