

VIROSES RESPIRATÓRIAS NO RIO GRANDE DO SUL

I — Isolamento e identificação do agente

Ivo G. de MATOS (1)

RESUMO

A ocorrência de infecções respiratórias causadas por vírus respiratórios, particularmente aquelas produzidas por Adenovírus, foi demonstrada pelo isolamento de cinco amostras a partir de lavados de garganta em pacientes de infecções respiratórias febris. Três amostras foram identificadas como tipo 1 e duas como sendo do tipo 7. Isolaram-se, também, cinco amostras de vírus Parainfluenza, três tipadas como Parainfluenza 1 e duas como Parainfluenza 3, o que vem mais uma vez, comprovar sua participação em casos de infecções respiratórias.

INTRODUÇÃO

O estudo das infecções respiratórias é um assunto que interessa às autoridades médicas de todo o mundo, pois trazem, mormente a gripe, quando de surtos epidêmicos ou pandêmicos, sérias repercussões para a economia de um país.

Os principais agentes de infecções respiratórias são os *Myxovirus*. Os principais componentes desse grupo são os vírus *Influenza*, como o demonstram os estudos relativos às epidemias e pandemias de influenza (LAIDLAW²³; SHOPE³¹; DAVENPORT & HENNESSY¹¹; DAVENPORT & col.¹⁰; MULDER & MASUREL²⁵). Outros não menos importantes integrantes deste grupo são os vírus *Parainfluenza*, cuja importância na etiologia de infecções respiratórias tem sido demonstrada (GERNGROSS¹⁵; GORBUNOVA & col.¹⁷; CHANOCK & col.⁸; VARGOSKO & col.³⁶).

Os *Adenovirus*, agentes de outro grupo muito importante, desempenham relevante papel na etiologia das infecções respiratórias humanas, responsáveis não só por doenças agudas febris (TYRREL & col.³²; ANDREWS & McDONALD¹; KJELLEN & col.²²), ocorrendo esporadicamente ou em surtos epidêmicos, como também por infecções latentes em amig-

dalas e adenóides em elevada percentagem de seres humanos (ROWE & col.²⁹; EVANS¹³; ZAIMAN & col.³⁷; PEREIRA & PEREIRA²⁷; ANDREWS & McDONALD¹; CURCIO & col.⁹; DREIZIN¹²; NASZ & col.²⁶; CARVALHO⁶; BRUNO-LOBO & col.⁵).

Ainda entre os vírus respiratórios deve ser incluído um grupo de relativa importância, o dos vírus *RS* (CHANOCK & col.⁷).

Os *Rhinovirus* constituem outro grupo causador de viroses respiratórias, sendo os principais agentes etiológicos do resfriado comum (TYRREL & BYNOE³³).

Existem ainda outros grupos, que, embora não estejam relacionados estritamente a síndrome respiratória como os já mencionados, incluem alguns tipos sorológicos que podem produzir eventuais infecções dos tractos respiratórios superior e inferior. Estes são representados, principalmente, pelos *Enterovirus* (LENNETTE & col.²⁴; RODEN & col.²⁸; VAN DER VEEN & col.³⁵; FUKUMI & col.¹⁴; SCHMIDT & col.³⁰).

Neste trabalho, descrevemos o isolamento de Adenovírus e vírus Parainfluenza a partir de doentes com infecções respiratórias agudas.

Trabalho realizado com o auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas

(1) Professor Titular da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas

MATERIAL E MÉTODOS

1) *Meios para cultivo de células HeLa:*

Meio I:

Solução de Gey completa ...	70%
Sêro humano	10%
Hidrolizado de lactoalbumina a 5%	10%
Extrato de levedura a 1% ..	10%

Meio II:

Solução de Gey completa	85%
Sêro de coelho	5%
Hidrolizado de lactoalbumina a 5%	10%

Meio III:

Solução de Gey completa ...	90%
Sêro de coelho	5%
Hidrolizado de lactoalbumina a 5%	5%

2) *Cultivo de células HeLa*

Uma linhagem de células HeLa, recebida do Instituto de Microbiologia da U.F.R.J., foi usada para o isolamento e propagação dos vírus, empregando-se o meio I para as culturas mantidas em frascos e o meio II para as culturas mantidas em tubos.

3) *Ovos embrionados*

Fêz-se também inoculações do material suspeito em ovos embrionados de galinha com 10-12 dias de incubação.

4) *Material pesquisado*

De recrutas militares recém-incorporados ao 9.º R.I., sediado em Pelotas, e portadores de infecções respiratórias, obtiveram-se 30 amostras de lavados de garganta por meio de gargarejos feitos com 10-20 ml de salinacalco a 10%, pH 7,2-7,4, ao qual se adicionavam 500 unidades de penicilina e 500 µg de estreptomicina por ml. Os fluidos prove-

nientes dos gargarejos foram centrifugados a 4000 rpm por 30 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C. Os sobrenadantes foram inoculados em ovos embrionados, para a pesquisa e possível isolamento de vírus Influenza ou Parainfluenza 1, e em cultura de células HeLa para a pesquisa de Adenovírus e Parainfluenza 1, 2 e 3. As primeiras inoculações foram efetuadas na cavidade amniótica de ovos embrionados, usando-se quatro ovos para cada material, e incubados a 37°C durante 48-72 horas. A partir dos fluidos coletados à primeira inoculação, foram efetuadas mais três passagens na cavidade alantóide, após o que foi coletado o líquido alantóico para pesquisa de hemaglutininas virais. O líquido era conservado a -70°C até o momento da prova.

Para os isolamentos em culturas de células usaram-se 5 tubos de HeLa, mantidos a 37°C, para cada amostra, inoculando-se 0,5 ml/tubo. Os tubos foram observados diariamente quanto à presença de efeito citopatogênico. O meio de cultura dos tubos era trocado cada 5 dias por meio III. As culturas positivas eram mantidas em incubação até efeito citopático total, isto é, descolamento de toda a camada celular.

5) *Teste de Hemaglutinação*

Os fluidos alantóicos foram examinados através de reações de hemaglutinação em placa escavada (Prestware Ltd., Londres), empregando-se a técnica de JENSEN & col.²⁰ com algumas modificações, para a verificação da presença e multiplicação dos vírus nos embriões inoculados.

Das amostras que apresentavam hemaglutinação, mesmo em títulos baixos, procedia-se a novas passagens em ovos embrionados até a obtenção de um volume apreciável de vírus.

6) *Teste de Inibição da Hemaglutinação*

Constatada a presença de vírus hemaglutinantes nos materiais coletados, usou-se a técnica preconizada por HIRST¹⁹ para a identificação das amostras isoladas. As amostras-padrões de vírus *Influenza* (PR-8/34, *Japan* 305/57, *Lee*/40) e *Parainfluenza* 1

(Sendai), assim como os respectivos anti-soros, foram cedidos pelo National Institute of Health, Bethesda, Md., U.S.A.

7) *Teste de Fixação do Complemento*

Fêz-se também em placas escavadas idênticas às anteriores. Os antígenos usados foram os sobrenadantes obtidos da centrifugação a 2000 rpm por 15 minutos, de uma parte das culturas que apresentavam efeito citopatogênico. Os soros-padrões para Adenovírus e Parainfluenza 1, 2 e 3 foram cedidos pelo National Institute of Health, Bethesda, Md., U.S.A.

8) *Teste de Neutralização*

Após identificação de grupo pelo teste anterior, determinou-se o tipo sorológico dos agentes isolados através de provas de neutralização em culturas de tecido (células HeLa).

RESULTADOS

Das 30 amostras de lavados de garganta de pacientes de infecções respiratórias, logramos isolar cinco amostras de Adenovírus, sendo três identificadas como tipo 1 e duas como tipo 7, e cinco amostras de vírus Parainfluenza, sendo três identificadas como tipo 1 e duas como tipo 3.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho nos mostram que os Adenovírus, assim como os Mixovírus, são agentes largamente espalhados na população estudada e intimamente associados com casos de infecções respiratórias agudas.

É de se notar, entretanto, que três das amostras por nós isoladas, foram identificadas como Adenovírus tipo 1, tipo este mais freqüentemente encontrado associado a infecções respiratórias agudas em crianças.

As duas outras amostras de Adenovírus, identificadas como de tipo 7, vieram reforçar a premissa de serem mais comumente encontradas em associação com surtos de infecções respiratórias agudas, especialmente em neo associações humanas como a de recrutas militares, ou em colégios (HILLEMANN & WER-

NER¹⁸; BELL & col.³; TYRREL & BYNOE³³; KENDALL & col.²¹; BOUCHER & col.⁴).

Os vírus Parainfluenza, isolados e identificados como tipos 1 e 3, são entidades que permanecem endêmicamente na população e em nossa amostragem, são pois isoláveis durante todo o ano, podendo produzir, no inverno, picos de infecção.

SUMMARY

Respiratory viruses infections in Rio Grande do Sul

I — *Recovery and identification of agent*

The occurrence of respiratory infections of viral origin, particularly those produced by Adenovirus, was demonstrated by the isolation of five strains of this agent from patients of febrile respiratory infections. Three strains were identified as type 1, and two as type 7.

Five strains of Parainfluenza virus were also isolated, three of type 1 and, two of type 3, which demonstrates once more the participation of this virus in respiratory infections.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREWS, B. E. & McDONALD, J. C. — Epidemiological studies of adenovirus infection. *Proc. Roy. Soc. Med.* 50:753-755, 1957.
2. BREEM, M.; WRIGHT, F. H.; HAMRE, D.; EGERER, R. & DEHME, M. — Association of the Chimpanzee Corysa agent with acute respiratory disease in children. *New Engl. J. Med.* 263:523-530, 1960.
3. BELL Jr., S. A.; ROTA, T. R. & McCOMB, D. E. — Adenoviruses isolated from Saudi Arabia. III — Six new serotypes. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 9:523-526, 1960.
4. BOUCHER, H.; SOHIER, R.; ROUMAGOUX, J.; GAUBERT, Y. & PETITJEAN, R. — Severe bronchopneumopathy caused by APC virus with probable pneumococcal super infection developing after influenza B virus infection. *Bull. Soc. Med. Hôp. (Paris)* 29: 937-942, 1956.
5. BRUNO-LOBO, G.; PEREIRA, M. S. & PEREIRA, H. G. — Estudos sobre adenovirose no Rio de Janeiro. *An. Microbiol.* 9 (Parte C):567-578, 1961.

6. CARVALHO, R. P. de S. — Contribuição para o estudo dos adenovirus. *Folia Clin. & Biol.* 29:28-64, 1960.
7. CHANOCK, R. M.; ROIZMAN, B. & MYERS, R. — Recovery from infants with respiratory illness of virus related to chimpanzee corysa agent (CCA). *Amer. J. Hyg.* 66:281-290, 1957.
8. CHANOCK, R. M.; VARGOSKO, R. LUCKEY, A.; COOK, M. K.; KAPIDIAN, A. Z.; REICHALDERFER, T. & PARROTT, R. H. — Association of hemadsorption viruses with respiratory illness in childhood. *J. Amer. Med. Ass.* 169:548-553, 1959.
9. CURCIO, F.; ROLLI, G.; FILIPPI, P. & BALDUCCI, D. — Recherches cliniques et epidemiologiques sur les adenovirus (APC) en Italie. *Scienza Med. Italica* 5:430-443, 1957.
10. 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.* 98:641-656, 1953.
11. DAVENPORT, F. M. & HENNESSY, A. V. — The clinical epidemiology of Asian Influenza. *Ann. Int. Med.* 49:493-501, 1958.
12. DREIZIN, R. S. — Isolation of latent adenovirus. *Vop. Virusol.* 1:29-33, 1957.
13. EVANS, A. S. — Latent adenovirus infections on the human respiratory tract. *Amer. J. Hyg.* 67:256-266, 1958.
14. FUKUMI, H.; NISHIKAWA, F.; SONOGUCHI, T. & SHIMIZU, T. — Isolation of Coe virus and some sero-epidemiological surveys of Coe virus infections. *Jap. J. Med. Sci. & Biol.* 14:21-25, 1961.
15. GERNGROSS, O. G. — Peculiarities of the 1956 influenza outbreak in Vladivostok due to D virus. *Probl. Virol.* 2:71-75, 1957.
16. GEY, G. O. & GEY, M. K. — The maintenance of human normal cells and tumor cells in continuous culture. *Amer. J. Cancer.* 27:45-75, 1936.
17. GORBUNOVA, A. S.; GERNGROSS, O. G.; MAGNORIZOVA, V. M. & BUKRINSKAYA, A. G. — Strains of influenza virus of type D isolated in Vladivostok, and their role in the etiology of the 1956 outbreak. (Preliminary communication). *Probl. Virol.* 2:76-84, 1957.
18. HILLEMAN, M. R. & WERNER, J. H. — Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 86:183-188, 1954.
19. HIRST, G. K. — The quantitative determination of influenza virus antibodies by means of red cell agglutination. *J. Exp. Med.* 75:49-64, 1942.
20. JENSEN, K. E. — Influenza. Diagnostic procedures for virus and Rickettsial diseases. *Amer. Pub. Health Ass.*, N. Y. 1956.
21. KENDALL, E. J. C.; RIDDLE, R. W.; TUCK, H. A.; RODAN, K. S.; ANDREWS, B. E. & McDONALD, J. C. — Pharyngoconjunctival fever, school outbreaks in England during the summer of 1955 associated with adenovirus type 3, 7 and 14. *Brit. Med. J.* 2:131-136, 1957.
22. KJELLEN, L.; STERNER, G. & SVEDMYR, A. — On the occurrence of adenovirus in Sweden. *Acta Paediatrica* 46:164-176, 1957.
23. LAIDLAW, P. P. — Epidemic influenza A virus disease. *Lancet* 1:1118-1124, 1935.
24. LENNETTE, E. H.; FOX, V. L.; SCHMIDT, M. J. & CULVER, J. L. — The Coe virus an apparently new virus recovered from patients with mild respiratory disease. *Amer. J. Hyg.* 68:272-287, 1958.
25. MULDER, J. & MASUREL, N. — Pre-epidemic antibody against 1957 strain of asiatic influenza. In serum older people living in the Netherlands. *Lancet* 1:810-814, 1958.
26. NASZ, I.; TOTH, M. & LENGYEL, A. — Adenovirus isolated from excised tonsils. *Acta Microbiol. Acad. Scient. Hung.* 5:267-269, 1958.
27. PEREIRA, M. S. & PEREIRA, H. G. — Coe virus properties and prevalence in Great Britain. *Lancet* 2:539-541, 1959.
28. RODEN, A. T.; PEREIRA, H. G. & CHAPRONIERE, D. C. — Infection of volunteers by a virus (APC type 1) isolated from human adenoid tissue. *Lancet* 2:592-596, 1956.
29. ROWE, W. O.; HUBNER, R. J.; HARTLEY, J. W.; WARD, T. G. & PARROTT, R. H. — Studies of the adenoidal-pharyngeal-conjunctival (APC) group of viruses. *Amer. J. Hyg.* 61:197-218, 1955.
30. SCHMIDT, M. J.; FOX, V. L. & LENNETTE, E. H. — Immunologic identification of coxsackie A21 virus with Coe virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 107:63-65, 1961.
31. SHOPE, R. E. — The incidence of neutralizing antibodies for Swine influenza virus in sera of human beings of different ages. *J. Exp. Med.* 63:655-668, 1936.
32. TYRREL, D. A. J.; BALDUCCI, D. & ZAIMAN, E. T. — Acute infections of the respiratory tract and the adenoviruses. *Lancet* 2:1326-1330, 1956.

33. TYRREL, D. A. J. & BYNOE, M. L. — Some futher virus isolated from commom colds. *Brit. Med. J.* 1:393-397, 1961.
34. VAN DER VEEN, J. & KOK, G. — Isolation and typing of adenovirus recovered from military recruits with acute respiratory disease in the Netherlands. *Amer. J. Hyg.* 65:119-129, 1957.
35. VAN DER VEEN, J.; OEI, K. G. & PRINS, A. — Isolatie van Coe virus vy patienten met un acute aandoening van de lucht-wegen. *Nederlands Tijdschrift voor Genes-kunde* 104:617-619, 1960.
36. VARGOSKO, A. J.; CHANOCK, R. M.; HUEBNER, R. J.; LUCKEY, A. H.; KIM, H. W.; CUMMING, C. & PARROTT, R. H. — Association of type 2 hemadsorption (para-influenza) virus and Asian influenza virus with infections croup. *New Engl. J. Med.* 261:1-9, 1959.
37. ZAIMAN, E.; BALDUCCI, D. & TYRREL, D. A. J. — A.P.C. viruses and respiratory disease in Northern England. *Lancet* 2:505-596, 1955.

Recebido para publicação em 25/10/1971.