

ISOLAMENTO DE VIRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL EM CRIANÇAS COM QUADROS RESPIRATÓRIOS AGUDOS

José Alberto N. CANDEIAS (1)

RESUMO

O Autor apresenta os resultados de uma tentativa de isolamento de vírus respiratório sincicial de um grupo de 24 crianças hospitalizadas com quadros respiratórios graves. Foram isoladas, em culturas de células HeLa quatro amostras de vírus respiratório sincicial de quatro casos de broncopneumonia, um dos quais complicado com bronquiolite. Todas as amostras isoladas ocasionaram efeito citopático típico e foram neutralizadas pelo sôro homólogo padrão.

INTRODUÇÃO

O presente trabalho foi iniciado com a finalidade de isolar o vírus respiratório sincicial, impròpriamente designado por vírus RS, de crianças com quadros respiratórios agudos em que aquêle vírus tem sido responsabilizado como agente etiológico. Os primeiros isolamentos foram obtidos por CHANOCK & col.^{4, 5, 6} e depois destes, numerosos Autores obtiveram resultados que parecem confirmar a vinculação etiológica do vírus respiratório sincicial aos quadros de broncopneumonia, bronquiolite e laringotraqueobronquite, particularmente em crianças muito jovens^{8, 14}. Pode dizer-se que êste vírus é muito provavelmente a causa mais importante das doenças infecciosas do tracto respiratório inferior, na infância¹². Em investigação anterior^{2, 3} demonstrámos a existência de anticorpos fixadores do complemento contra o vírus respiratório sincicial em grupos populacionais do Território Federal do Amapá.

Apresentamos neste trabalho, primeiro de uma série de pesquisas a serem realizadas no Estado de São Paulo, os resultados da tentativa de isolamento do vírus respiratório sincicial num grupo de 24 crianças, com

quadros respiratórios graves, internadas no Hospital Infantil Menino Jesus, na cidade de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram usadas culturas de células HeLa em Gey contendo 10% de lactalbumina a 5%, 10% de sôro de coelho inativado a 56°C durante 30 minutos, penicilina e estreptomicina, respectivamente na concentração final de 100 U e 100 microgramas/ml. O meio de manutenção usado diferia do meio de crescimento na percentagem tanto da lactalbumina, que foi baixada para 5%, como do sôro também usado na concentração de 5%.

O preparo dos tubos de cultura de HeLa foi feito inoculando-se 0,5 ml da suspensão de células contendo 50.000 células por ml, em cada tubo; no dia imediato inoculavam-se 0,5 ml da solução de Gey contendo 5% de sôro de coelho. Dêste modo reduzia-se a concentração de lactalbumina, ao mesmo tempo que se conseguia uma camada de células perfeitamente coberta pelo meio de cultura, condição indispensável para um exame que se manteve durante três semanas.

Trabalho da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas (Prof. Dácio de Almeida Christovão) da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Brasil

(1) Instrutor da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas

A troca do meio de manutenção foi feita cada três dias.

De cada criança colheu-se material das mucosas nasal e naso-faríngea, usando duas zaragatoas, cada uma das quais era imersa em 5 ml de solução de Hanks contendo 2.000 U de penicilina, 2.000 microgramas de estreptomicina e 150 U de micostatina, por ml. Uma vez no laboratório os dois espécimens eram misturados numa só amostra, de que se inoculavam 0,2 ml em cada um de quatro tubos de cultura de células HeLa que se incubavam a 36°C. Os tubos eram observados diariamente durante 21 dias e as amostras que apresentavam efeito citopático típico eram submetidas a duas passagens consecutivas depois do que se procedia à titulação.

Para a titulação do poder infetante do vírus inoculou-se 0,1 ml de diluições decimais da amostra positiva em cada um de quatro tubos de cultura de células HeLa. Estes foram observados diariamente, fazendo-se a leitura final no 10.º dia, momento a partir do qual não mais se observa a progressão das alterações citopáticas.

Para a execução da prova de neutralização com soro padrão, fizeram-se misturas, em volumes iguais, da diluição do soro padrão contendo 20 U neutralizantes e da diluição de vírus contendo 100 TCD₅₀/0,1 ml, que se mantiveram à temperatura ambiente durante 60 minutos. Inocularam-se em seguida 4 tubos de culturas de células HeLa, recebendo cada um deles 0,2 ml da mistura vírus/soro padrão, ao mesmo tempo que se repetia a titulação do vírus. A leitura final era feita no 6.º dia após a inoculação.

RESULTADOS

Isolamento de vírus respiratório sincicial

— Foram isoladas 4 amostras de vírus respiratório sincicial do grupo já referido de 24 crianças com quadros respiratórios agudos, internadas no Hospital Infantil Menino Jesus, durante o mês de agosto de 1964. Este grupo compreendia 22 casos de broncopneumonia, 2 dos quais com bronquiolite e 2 outros complicados com um quadro de desnutrição; havia ainda 2 casos de bronquiolite. As amostras de vírus respiratório sincicial foram isoladas de uma criança com broncopneumonia e desnutrição, de 3 meses

de idade, de duas crianças com broncopneumonia e bronquiolite, uma delas com 3 dias de idade e a outra com 3 meses, e de uma criança com broncopneumonia, com 45 dias de idade. As tentativas de isolamento do referido agente das restantes crianças do grupo não foram bem sucedidas, muito embora as culturas se tivessem mantido em excelentes condições durante três semanas. Qualquer das amostras isoladas pôde ser transmitida, em série, a novas culturas de células HeLa, usando-se o sobrenadante, e os títulos obtidos foram, em geral, baixos, variando entre 10³ e 10⁵.

As amostras positivas foram mantidas a -20°C até ulterior identificação com soro padrão homólogo, depois de terem sido reinoculadas em novas culturas de HeLa, até obtenção de um título de 10⁵.

Efeito citopático nas culturas de célula HeLa — O efeito citopático começou a manifestar-se ao fim do 7.º dia prolongando-se até o 12.º dia, sem que tivesse sido destruída toda a camada celular. Eram evidentes as características áreas sinciciais, onde os limites celulares desaparecem e uma massa de citoplasma quase homogêneo encerra grande número de núcleos normais. Preparações coradas, feitas em lamínula, permitiram observar com mais nitidez estas alterações típicas, sendo então evidentes as inclusões citoplásmicas eosinófilas.

DISCUSSÃO

Um dos achados de particular interesse no presente trabalho foi o reduzido número de casos em que se isolou o vírus respiratório sincicial. Seria de esperar uma taxa de isolamento mais elevada, dada a natureza dos quadros clínicos em questão e a idade das crianças atingidas^{7, 10, 11, 16}. Muito provavelmente teriam contribuído para esta baixa percentagem de isolamento o fato das amostras terem sido mantidas a 4°C, cerca de 1 a 2 horas, antes de inoculadas as culturas de células, bem como a ausência de um estabilizador no meio de transporte^{1, 9}. Por outro lado, não devemos deixar de considerar as variações de sensibilidade das linhagens de células¹³, que podem ser um excelente substrato para o crescimento de

uma amostra de vírus já adaptada, mas não serem suficientemente sensíveis para o isolamento. Fatos desta natureza foram demonstrados por numerosos Autores^{15, 17}.

Um outro aspecto interessante e que se torna necessário ressaltar é o que diz respeito ao fato das amostras terem sido mantidas a -20°C durante cêrca de dois anos, sem alteração de sua viabilidade, o que parece estar em desacôrdo com as observações de diversos Autores^{7, 1, 8}. Deve notar-se, no entanto, que a grande sensibilidade do vírus respiratório sincicial ao congelamento é um elemento a ser observado mais em relação aos espécimes colhidos dos pacientes, onde o número de partículas de vírus pode ser pequeno, do que em relação à cultura de vírus em geral, com título elevado.

SUMMARY

Isolation of the respiratory syncytial virus from children with acute respiratory infections

Four strains of respiratory syncytial virus which produced the usual cytopathic effect and were neutralized by the homologous standard serum, were isolated from children with respiratory infections, in HeLa cells. The clinical features of their illnesses were those of bronchopneumonia and bronchiolitis.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Dra. M. S. Pereira, do Virus Reference Laboratory, Colindale, London, pelos valiosos conselhos e a Dra. C. M. Bradstreet, do Standards Laboratory of Serological Reagents do Central Public Health Laboratory, Colindale, por ter gentilmente colocado a nossa disposição todos os reagentes padrões de que necessitamos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEEM, M.; WRIGHT, F. H.; HAMRE, D.; EGERER, R. & OEHME, M. — Association of chimpanzee coryza agent with acute respiratory disease in children. *New Eng. J. Med.* 263:523-530, 1960.
2. CANDEIAS, J. A. N. & CHRISTOVÃO, D. de A. — Pesquisa de anticorpos fixadores

de complemento para vírus respiratório sincicial em grupos da população do Território Federal do Amapá, Brasil. *Arg. Fac. Hig. São Paulo* 20:87-97, 1966.

3. CANDEIAS, J. A. N. & HIMELFARB, L. — Pesquisa de anticorpos fixadores de complemento para vírus respiratório sincicial em habitantes da cidade de São Paulo. (Em publicação nos *Arg. Fac. Hig. São Paulo*, 1966).
4. CHANOCK, R. M. — Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup. *J. Exp. Med.* 104:555-575, 1956.
5. CHANOCK, R. M.; ROIZMAN, B. & MYERS, R. — Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I — Isolation, properties and characterization. *Amer. J. Hyg.* 66:281-290, 1957.
6. CHANOCK, R. M. & FINBERG, L. — Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent. (CCA). II — Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Amer. J. Hyg.* 66:291-300, 1957.
7. CHANOCK, R. M.; PARROTT, R. H.; VARGOSKO, A. J.; KAPIKIAN, A. Z.; KNIGHT, V. & JOHNSON, K. M. — Acute respiratory diseases of viral etiology: respiratory syncytial virus. *Amer. J. Public Health* 52: 918-925, 1952.
8. CHANOCK, R. M.; KIM, H. W.; VARGOSKO, A. J.; DELEVA, A.; JOHNSON, K. M.; CUMMING, C. & PARROTT, R. M. — Respiratory syncytial virus: virus recovery and other observations during 1960 outbreak of bronchiolitis, pneumonia, and minor respiratory diseases in children. *J.A.M.A.* 176: 647-653, 1961.
9. HAMPARIAN, V. V.; KETLER, A.; HILLEMANN, M. R.; REILLY, C. M.; McCLELLAND, L.; CORNFELD, D. & STOKES Jr., J. — Studies of acute respiratory illnesses caused by respiratory syncytial virus. I — Laboratory findings in 109 cases. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 106:717-722, 1961.
10. HILLEMANN, M. R. — Respiratory syncytial virus. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 88:181-189, 1962.
11. HILLEMANN, M. R.; HAMPARIAN, V. V.; KETLER, A.; REILLY, C. M.; McCLELLAND, L.; CORNFELD, D. & STOKES Jr., J. — Acute respiratory illness among children and adults. *J.A.M.A.* 180:445-453, 1962.
12. HUEBNER, J. R. — Viral respiratory disease in Americas. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 88:1-13, 1962.

13. NAKANO, M. — The development of variants of HeLa cells possessing resistance against the cytopathogenic effect of ECHO viruses. *Japan J. Med. Sci. Biol.* 12:79-97, 1959.
14. PARROTT, R. H.; VARGOSKO, A. J.; KIM, H. W.; CUMMING, C.; TURNER, H.; HUEBNER, R. J. & CHANOCK, R. M. — Respiratory syncytial virus: serologic studies over a 34 month period of children with bronchiolitis, pneumonia, and minor respiratory diseases. *J.A.M.A.* 176:653-657, 1961.
15. PUCK, T. T. & FISHER, H. W. — Genetics of somatic mammalian cells. I — Demonstration of the existence of mutants with different growth requirements in a human cancer cell strain (HeLa). *J. Exp. Med.* 104:427-433, 1956.
16. SANDIFORD, B. R. & SPENCER, B. — Respiratory syncytial virus in epidemic bronchiolitis of infants. *Brit. Med. J.* 2: 881-882, 1962.
17. TAYLOR-ROBINSON, D.; HUCKER, R. & TYRRELL, D. A. J. — Studies on the pathogenicity for tissue cultures of some viruses isolated from common colds. *Brit. J. Exp. Path.* 43:189-193, 1962.

Recebido para publicação em 30/8/1966.