

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIOVÍRUS EM SÃO PAULO DE 1967 A 1970 ⁽¹⁾

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF POLIOVIRUS IN SAO PAULO, BRAZIL
FROM 1967 TO 1970

JOSÉ PAULO GONZAGA DE LACERDA ⁽²⁾
ELZA FRANCO DE LIMA VIEIRA ⁽²⁾
BIENVENIDO SÁEZ MARTÍN ⁽²⁾
LÚCIA SOUTO GIUSTI ⁽²⁾

S U M M A R Y

Results of isolation and identification of poliovirus from stools, oral swab and spinal fluid in 800 cases are related.

We worked with HeLa and AV₃ cells using the Lepine's concentration technique.

Four hundred ninety cases resulted positive: 379 for Poliovirus I, 35 for poliovirus II, and 76 for Poliovirus III.

I N T R O D U Ç Ã O

Em nossos trabalhos durante os anos de 1967 a 1970 tivemos a oportunidade de isolar e identificar poliovírus de pacientes com suspeita clínica de poliomielite de diferentes unidades assistenciais da Cidade de S. Paulo e de alguns materiais enviados de outras cidades do interior. Também, em material de crianças com menos de 1 mês de idade, apresentando distúrbios intestinais mas sem paralisia, foram pesquisados poliovírus nas fezes e em material de garganta.

Não podendo contar com culturas celulares primárias de rim de macaco rhesus conforme descrevem WALLIS, LEWIS & MELNICK ⁷ e culturas primárias de âmniom humanos segundo ZITCER ⁹, utilizamos somente células de linhagem contínua para isolamento e identificação dos vírus.

Usamos HeLa e AV₃ com pequenas modificações nas inoculações e passagens do material para fazer frente a menor sensibilidade das células. Com estas modificações passamos a isolar vírus de 85 a 90% dos casos.

Durante essas pesquisas pudemos constatar que na maioria dos casos os vírus foram mais facilmente isolados em HeLa do que em AV₃, quando procedíamos à inoculação simultânea nas duas linhagens de células.

MATERIAL E METODOS

Utilizamos para o isolamento de vírus fezes colhidas em latas para exame parasitológico ou de "swab" retal. Na maior parte dos casos foram colhidas duas amostras de material com 24 ou 48 horas de intervalo. O material de garganta foi colhido em "swabs" por ser mais fácil. O líquido céfalo-raquidiano, colhido em tubo estéril, sendo levado ao laboratório em seguida.

O material proveniente da Capital foi coletado em "swab" e levado ao laboratório a temperatura ambiente pois o tempo de transporte foi curto. Já o material proveniente de outras localidades com transporte demorado veio acondicionado em latas seladas com esparadrapo e transportado sob refrigeração com gelo comum.

(1) Trabalho realizado na Seção de Vírus Respiratórios e Entéricos do Instituto Adolfo Lutz. Patrocinado pelo Fundo de Pesquisas do I.A.L.

(2) Da Seção de Vírus Respiratórios e Entéricos do I.A.L.

1. Preparo de inóculo de "swab"

O material recebido ficou congelado a -70°C até o momento da manipulação. Uma vez descongelado, o algodão foi espremido contra a parede do tubo para extração do material e então, adicionados 8 ml de meio de Hanks, pH 7,4, para lavar o algodão.

2. Preparo de inóculo de fezes

Preparamos uma emulsão a 20% p/v* do material em meio de Hanks. Aproximadamente 4 g de fezes foram colocadas em gral estéril e trituradas, adicionando-se pequenas quantidades de meio para facilitar a emulsão e depois o resto do meio completando o volume para 20 ml.

3. Centrifugação dos inóculos

Centrifugamos em centrífuga refrigerada a 4°C por 1 hora e a 12 000 g (10 000 r.p.m.). Assim eliminamos as bactérias e substâncias tóxicas para as células. O sobrenadante foi cuidadosamente separado para não resuspendar o sedimento e transferido para frascos apropriados para estocagem e tratado com antibióticos na quantidade de 2 000 unidades de penicilina, 1 000 mg de estreptomomicina e 2,5 mg de Fungison por ml de líquido.

4. Inoculação em células

Passamos a utilizar inoculação de volumes maiores por tubo conforme descreve LEPINE⁴ para concentração de vírus, com a finalidade de suprir a menor sensibilidade das células por nós utilizadas em relação às culturas primárias.

Nas inoculações iniciais e mesmo nas primeiras passagens inoculamos de 0,3 até 0,7 ml de material por tubo de célula em vez de 0,2 ml recomendado na maioria das técnicas virológicas.

Cada material foi inoculado em dois tubos de células HeLa e dois de AV₃ previamente lavados com salina para retirar o meio de crescimento e adicionado de 1 ml de meio de Hanks com hidrolizado de lactoalbumina, extrato de levedura e triptose fosfato.

Preferimos para o isolamento utilizar meio sem soro, pois conforme descrevem vários autores — BARTELL & KLEIN², ALLEN, FIN-

KELSTEIN & SULKIN¹ e SMULL & LUDWIG⁶, o soro de bovinos e de outros animais podem conter inibidores para vírus que impedem o isolamento.

O líquido céfalo-raquidiano foi inoculado em células nas mesmas quantidades empregadas para os inóculos de fezes, de "swab" ou de material de garantia, isto é, 0,3 a 0,7 ml por tubo. Para este tipo de material fizemos passagens adicionais, chegando a 4 ou 5 passagens cegas para conseguir isolamento de vírus.

Os vírus isolados foram titulados e tipados nas mesmas linhagens de células nas quais o isolamento foi conseguido. Fizemos a soro-neutralização com soros imunes para pólio tipos I, II e III contendo 20 unidades neutralizantes para 100 DCT₅₀/0,1 ml. Incluímos nas identificações uma mistura dos três tipos de soro para determinar possíveis misturas de tipos diferentes de vírus.

5. Sorologia

Realizamos na maioria dos casos, em duas amostras de soro, uma primeira colhida o mais cedo possível em relação ao início da doença, e uma segunda, de 10 a 15 dias após a primeira amostra.

O soro foi diluído em solução de Hanks de 1:3 a 1:1024 e, a um volume de soro nestas diluições, distribuído em 3 séries de tubos, colocamos volume idêntico de vírus dos tipos I, II e III com 100 DCT₅₀/0,1 ml em cada uma das séries respectivamente. Esta mistura permaneceu em estufa a 37°C , 4 horas, e depois uma noite em geladeira antes de ser inoculada em tubos de células.

RESULTADOS

Observando os dados obtidos constatamos que a partir de outubro de 1967 passamos a isolar poliovírus tipo I todos os meses. No final do ano seguinte tivemos uma ascensão no número de identificações de pólio I que atingiu o maior valor em janeiro e abril de 1969. De 1968 para cá, o isolamento de poliovírus tipo II diminuiu sensivelmente e o de poliovírus tipo III teve ligeiro aumento no ano de 1969, declinando em seguida.

Entre nós, o número de isolamento de poliovírus do tipo I sempre foi bem maior que o dos outros dois tipos; isto pode ser comparado, em porcentagem, no quadro I:

* p/v = peso em volume.

QUADRO I

Porcentagem dos três tipos de poliovírus isolados

Pólio tipo	1967 %	1968 %	1969 %	1970 %
I	37,5	70,6	78,2	88,2
II	37,5	15,2	3,3	1,4
III	25,0	14,2	18,5	10,4

No início de 1969 tivemos o maior índice de isolamento em relação ao total de casos pesquisados, atingindo nos quatro primeiros meses 84%, 86%, 83% e 88% de casos positivos.

O número total de casos pesquisados e o número de casos positivos, nos diferentes meses do ano, estão relacionados no quadro II.

QUADRO II

Número de poliovírus isolados nos diferentes meses

	1967	1968	1969	1970
Jan	0/2	0/11	26/31	2/4
Fev	1/4	5/21	26/30	7/13
Mar	1/3	3/14	24/29	5/7
Abr	2/4	14/23	30/34	4/10
Mai	1/2	4/11	20/25	10/21
Jun	0/6	9/12	21/35	11/17
Jul	5/16	6/8	14/15	6/8
Ago	3/21	6/11	14/20	6/13
Set	3/15	10/17	10/16	11/18
Out	2/9	21/30	13/23	10/12
Nov	4/18	15/20	7/14	30/38
Dez	2/4	19/26	5/12	31/37
Totais	24/104	112/204	210/284	144/208

O numerador representa os casos positivos e o denominador, o total de casos pesquisados.

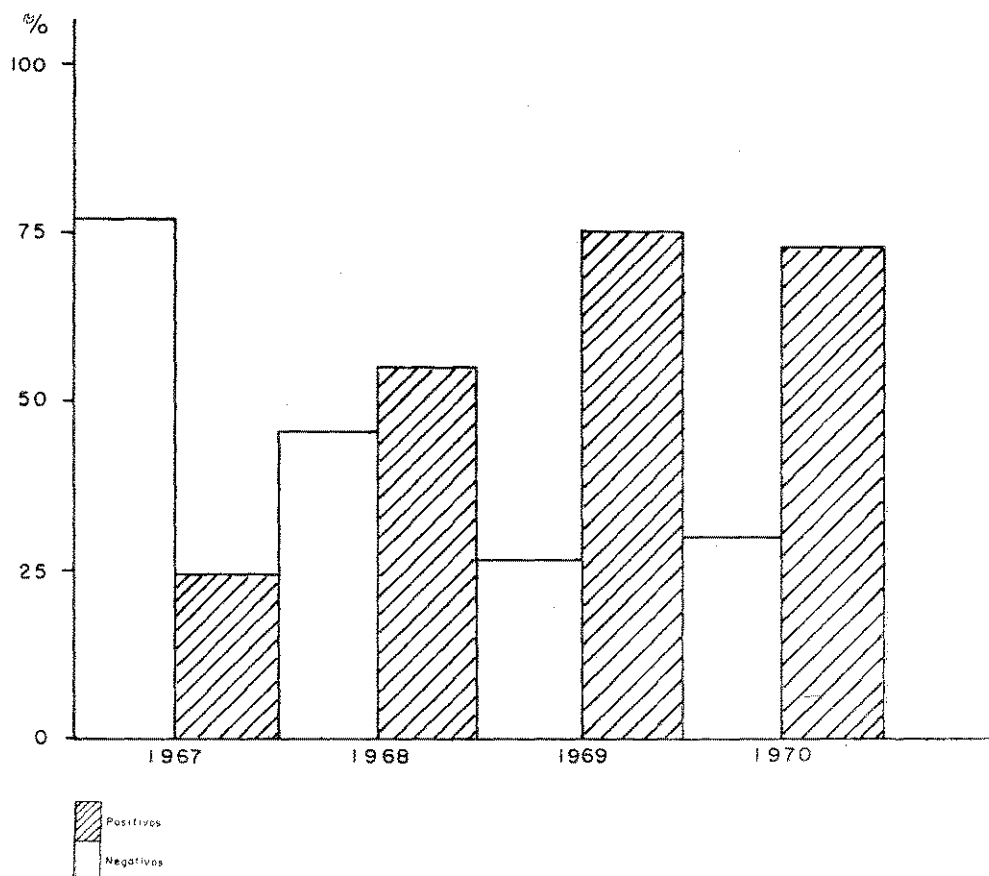
QUADRO III

Número de amostras de poliovírus I, II e III isoladas

Ano	1967			1968			1969			1970			
	Tipo	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Meses													
Jan		0	0	0	0	0	0	26	0	0	2	0	1
Fev		0	1	0	3	2	0	20	0	6	2	0	5
Mar		1	0	0	2	0	1	16	0	8	5	0	0
Abr		0	2	0	3	8	3	26	2	2	3	0	1
Mai		1	0	0	3	1	0	16	0	4	10	0	0
Jun		0	0	0	5	2	2	17	1	3	10	0	1
Jul		2	2	1	3	1	2	10	1	3	5	1	0
Ago		1	1	1	4	1	1	9	1	1	6	0	0
Set		0	0	3	9	0	1	5	2	3	9	0	2
Out		1	1	0	17	1	3	8	0	5	9	0	1
Nov		2	1	1	13	1	1	6	0	1	27	0	3
Dez		1	1	0	17	0	2	5	0	0	29	1	1
Totais		9	9	6	79	17	16	164	7	39	127	2	15

No Quadro III apresentamos o número de amostras isoladas de cada tipo de vírus, onde notamos logo a maior quantidade de identificações de poliovírus tipo I a que já nos referimos.

Dos 800 casos examinados foram colhidas 126 amostras de material de garganta, com o isolamento de 10 amostras de poliovírus tipo I, uma do tipo II e 8 do tipo III. Em 3 casos isolamos o mesmo tipo de vírus de



fezes e de material de garganta. Em 8 casos em que isolamos vírus só de orofaringe, as crianças tinham menos de um mês e nos outros 8 casos positivos pesquisamos o vírus apenas em orofaringe.

Examinamos 47 amostras de líquido céfalo-raquidiano e isolamos 7 amostras de vírus; de poliovírus tipo I, encontramos 6 amostras e, do tipo III, uma amostra.

Fizemos a sêro-neutralização em aproximadamente 85% dos casos e, na maioria, o título já era alto na primeira amostra e não houve alteração na 2.^a amostra. Em 20% dos casos encontramos aumento de título para o tipo de vírus isolado e em raros casos constatamos o aumento de título sem conseguir isolamento das fezes.

DISCUSSÃO

No início de nossos trabalhos em enterovírus, verificamos que o índice de isolamento

de poliovírus de casos com paralisia era inferior ao descrito na literatura WENNER⁸ e CHADWICK⁹.

Tentando reparar esta falha empregamos técnica de concentração do material LEPINE⁴ e MELNICK⁵, para obter maior número de partículas virais por volume de inóculo.

Inoculando de 0,3 a 0,7 ml por tubo, o efeito tóxico foi mínimo não sendo preciso troca de meio de manutenção, facilitando o trabalho. Com o uso desta técnica obtivemos isolamento de 88% dos casos pesquisados, mesmo utilizando células de linhagem contínua para o isolamento de vírus. Outras técnicas de concentração foram por nós experimentadas porém logo abandonadas devido ao maior número de manobras e dificuldades de operação.

Durante estas pesquisas, os vírus foram isolados de material fecal e somente de raros casos de material de garganta. De algumas crianças com poucos dias de idade

(de 10 a 35 dias) foram isolados poliovírus da garganta, mas sem a confirmação sorológica; de adultos, obtivemos isolamento de vírus e a confirmação sorológica correspondente.

Chamamos a atenção para o fato de, nos casos positivos para poliovírus encontramos predominância acentuada para o tipo I (Quadro I). Na sorologia também este fato é notado pois, em muitos casos, encontramos título igual a 1024 para pólio tipo I e títulos de 8 ou 16 para os outros dois tipos, em crianças não vacinadas. Com títulos mais elevados, variando até 128 em crianças de maior idade e com uma ou duas doses de vacina. Títulos de anticorpos maiores são encontrados nos adultos e em algumas crianças.

Nos casos estudados, não caberia fazer um estudo dos níveis de anticorpos encontrados e dos grupos etários, pelo fato de serem as amostras colhidas na fase aguda e em períodos diversos do início da doença, podendo acarretar uma idéia errônea do estado imunitário.

RESUMO

Foram apresentados resultados obtidos no isolamento de poliovírus em fezes, líquido céfalo-raquidiano e material de garganta de pacientes suspeitos de poliomielite. Foram examinados materiais de 800 pessoas, com a idade variando de 10 dias até 70 anos, provenientes, na maioria dos casos, de pacientes hospitalizados.

De 490 pacientes foram isoladas amostras de poliovírus assim distribuídas: 379 de poliovírus tipo I, 35 de poliovírus tipo II e 76 de poliovírus tipo III.

A sorologia por neutralização em culturas celulares foi realizada para confirmação pelo aumento do título de anticorpos, e tipo de vírus isolado.

Agradecimentos — Agradecemos a cooperação da Dra. Clélia Helena O. Martinez e auxiliares da Seção de Culturas celulares do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, pelos tubos de células fornecidos o que permitiu a realização do presente trabalho.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALLEN, R.; FINKELTEIN, R. A. & SULKIN, S. E. — Viral inhibitors in normal animal sera. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 16:472-8, 1958.
2. BARTELL, D. & KLEIN, M. — Neutralizing antibody to viruses of poliomyelitis in sera of domestic animal. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 90:597-601, 1955.
3. CHADWICK, D. L.; WELSH, H. H. & LENNETTE, E. H. — Comparison of the sensitivity of mammalian cell types for the isolation of poliomyelitis viruses from man. *J. Lab. Clin. Med.*, 54:409-16, 1959.
4. LÉPINE, P. & MAURIN, J. — *Techniques de laboratoire en virologie humaine: isolements, identification, serologie, diagnostique*. Paris, Masson, 1964. p. 499.
5. MELNICK, J. L.; WENNER, H. A. & ROSEN, L. — *The enteroviruses*. In: LENNETTE, E. H., *Diagnostic procedures for viral and rickettsial diseases*. 3ed. New York, N.Y., A.P.H.A., 1964. p. 217.
6. SMULL, C. E. & LUDVIG, E. H. — Delay of poliovirus plaque formation with use of fresh bovine serum in the growth medium of host cells. *App. Microbiol.*, 17:449-53, 1969.
7. WALLIS, C.; LEWIS, R. T. & MELNICK, J. L. — Preparation of kidney cell cultures. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 19:194-7, 1961.
8. WENNER, H. A. & MILLER, C. A. — Comparison of methods for recovering poliomyelitis virus from human sources. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 86:11-5, 1954.
9. ZITCER, E. M.; FOGH, J. & DUNNEBACKE, T. H. — Human amnion cells for large-scale production of polio virus. *Science*, N.Y., 122:30, 1955.

Recebido para publicação em 30 de junho de 1971.

