

ESTUDO SOROLÓGICO DE INFECÇÕES OCASIONADAS POR CITOMEGALOVÍRUS *

J. A. N. CANDEIAS **
Klaus E. STEWIEN **
Victório BARBOSA ***

RSPU-B/221

CANDEIAS, J. A. N. et al. — *Estudo sorológico de infecções ocasionadas por citomegalovírus. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 8:257-63, 1974.*

RESUMO: Estudou-se a distribuição etária e por sexo de anticorpos fixadores do complemento para citomegalovírus em 1294 soros de indivíduos do município de São Paulo. A uma porcentagem de positividade de 33%, nos primeiros quinze anos de vida, seguiu-se, após uma queda inicial no nível de anticorpos, um aumento progressivo até níveis de ordem de 70%. Não se observaram diferenças de positividade significativas em relação ao sexo. A comparação dos resultados obtidos com a reação de fixação do complemento e a reação de neutralização, numa amostra de 236 soros de indivíduos adultos, usando-se a cepa de citomegalovírus AD 169, evidenciou uma boa correlação.

UNITERMOS: Infecções (estudo sorológico) *; Citomegalovírus *; Anticorpos fixadores de complemento *.

I N T R O D U Ç Ã O

O citomegalovírus humano é um agente infeccioso de ocorrência ubiqüitária, podendo ser isolado do leite materno, saliva, urina, da secreção do cervix uterino e da placenta^{1, 10, 22, 35}. As formas mais graves desta virose humana ocorrem no período neo-natal e resultam da infecção *in utero*^{14, 21}. Têm sido descritas infecções no período pós-natal, até cerca de 4 anos de idade, momento a partir do qual a doença se torna mais rara.^{17, 31}

Em adultos só ocasionalmente são descritos quadros clínicos etiologicamente relacionados com citomegalovírus.^{2, 16} Recentemente, este vírus tem sido relacionado etiologicamente com quadros clínicos que apresentam grande semelhança com a mononucleose infecciosa e se manifestam após transfusões sanguíneas.^{19, 20, 23} Os estudos sorológicos mostram um aumento progressivo dos níveis de anticorpos com a idade.^{7, 18, 32} A reação de

* Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP — "Setor Saúde Pública" — Av. Dr. Arnaldo, 715 — São Paulo, SP — Brasil

** Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP — Cidade Universitária — São Paulo, SP — Brasil

*** Do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP — Av. Dr. Arnaldo, 715 — São Paulo, SP — Brasil

fixação do complemento é a prova de excelência no diagnóstico sorológico de rotina, recomendando-se o uso da cêpa AD 169, por possuir um espectro de atividade mais amplo⁸. A prova de neutralização pode, eventualmente, ser utilizada em levantamentos sorológicos, mas tem o inconveniente de fornecer resultados com certo grau de heterogeneidade, possivelmente, em conseqüência da diferente estrutura antigênica das várias cêpas de citomegalovírus¹¹ e da ocorrência de reações cruzadas com outros herpesvírus. A pesquisa de anticorpos para citomegalovírus pode ainda ser feita por aglutinação de plaquetas²⁸, imunofluorescência¹³ e hemaglutinação passiva²⁹.

No presente trabalho são apresentados os resultados de um estudo sorológico da infecção por citomegalovírus numa população adulta e infantil normal do município de São Paulo, utilizando-se a reação de fixação do complemento e a reação de neutralização.

MATERIAL E MÉTODOS

Cêpa de vírus — Foi usada a cêpa AD 169, mantida em culturas de células diplóides humanas (HFDL); o meio de crescimento usado foi o meio de Eagle concentrado, em Earle, com 10% de soro fetal bovino, 1% de glutamina a 3%, 2,5% de solução de bicarbonato de sódio a 2,8%, 1% de uma mistura de penicilina e estreptomina e 0,1% de fungizona; como meio de manutenção usou-se o meio de Eagle simples, em Earle, adicionado das mesmas concentrações dos suplementos referidos, com exceção do soro fetal bovino, que se utilizou na concentração de 2%. A passagem do vírus foi feita por tripsinização da camada celular, previamente infetada, e inoculação da suspensão de células infetadas em novas culturas celulares preparadas em tubos ou garrafas de Roux, conforme a finalidade.

Reação de fixação do complemento — Para o preparo do antígeno fixador do complemento usaram-se culturas em garrafas de Roux com cerca de 75% de efeito citopático; depois de eliminado o meio de cultura, a camada celular foi lavada com PBS e tripsinizada, centrifugando-se a suspensão celular a 1500 rpm, durante 15 min e resuspendendo-se o sedimento em VBS (cerca de 1/5 do volume original); em seguida procedeu-se ao congelamento e descongelamento, por três vezes, clarificando-se a suspensão a 800 rpm durante 10 min. O antígeno foi inativado a 56°C, durante 30 min e titulado, tendo-se obtido títulos que variavam, conforme a partida, entre 16 e 64. O antígeno usado na reação de fixação do complemento continha 2 unidades.

Os soros de prova foram testados na diluição a 1:8, após inativação a 56°C durante 30 min; a reação de fixação do complemento foi feita em placas de Perspex (WHO), usando-se 2 unidades exatas de complemento e fixação a 4°C, de um dia para o outro; para que um soro fosse considerado positivo teria de ocasionar uma fixação de 75-100%.

Reação de neutralização — Diluições dos soros a 1:8 foram misturadas, em volumes iguais, com uma suspensão de vírus contendo 10 a 30 DCT₅₀; o diluente usado continha 5% de soro fetal bovino. Depois de incubada a mistura a 37°C, durante 60 min, inocularam-se dois tubos de cultura de células diplóides humanas (HDFL) com 0,2 ml das misturas vírus-soro. O critério seguido por BENYESH-MELNICK⁵ foi utilizado para estabelecer a positividade dos soros testados.

Soros de prova — Através da reação de fixação do complemento foram estudados 1.182 soros de indivíduos adultos, de idade variando entre 15 e 35 anos ou mais, colhidos entre 1969 e 1973 e conservados a -20°C. Deste total foi separada uma amostra casual de 236 soros, que foram testados pelas reações de fi-

xação do complemento e neutralização. Usando-se a reação de fixação do complemento, foram ainda estudados 112 soros de crianças normais, de 0 a 15 anos de idade, colhidos em 1973 e conservados igualmente a -20°C .

RESULTADOS

Os resultados da reação de fixação do complemento nas amostras de soro estudadas são apresentados na Tabela 1. O número reduzido de soros de crianças que puderam ser estudados só permitiu o cál-

culo do percentual de positividade para um grupo etário de grande amplitude (0 a 15 anos), obtendo-se um valor de 33%; no grupo etário de 15 a 25 anos a porcentagem de positividade foi de 27%; já no grupo etário de 25 a 35 anos esta porcentagem se elevou para 61%, atingindo o valor de 70% em indivíduos de idade igual ou superior a 35 anos. Nesta mesma Tabela podem ser comparadas as porcentagens de positividade por sexo, que, para todas as idades, foram de 51% nos indivíduos do sexo masculino e 54% nos de sexo feminino.

TABELA 1

Distribuição etária e por sexo dos soros positivos na reação de fixação do complemento, usando a cêpa de citomegalovírus AD 169

Idade (anos)	Sexo masculino			Sexo feminino			Total		
	Número soros testados	Soros positivos		Número soros testados	Soros positivos		Número soros testados	Soros positivos	
		N.º	%		N.º	%		N.º	%
0 — 15	64	18	28	48	19	39	112	37	33
15 — 25	165	42	25	170	49	28	335	91	27
25 — 35	187	129	68	193	103	53	380	232	61
35 — 45	243	153	62	224	174	77	467	327	70
Total	659	342	51	635	345	54	1294	687	53

Na Tabela 2 são comparados os resultados obtidos numa amostra casual de 236 soros, escolhida do total de 1.182 soros de indivíduos adultos, usando-se as reações de fixação do complemento e neutralização; observam-se porcentagens de positividade mais elevadas com a rea-

ção de neutralização, porcentagens estas com valores, respectivamente, de 41%, 80% e 84%, para cada um dos grupos etários. A reação de fixação do complemento deu, para os mesmos grupos etários, porcentagens de positividade de 23%, 58% e 70%.

T A B E L A 2

Distribuição etária de uma amostra de soros positivos nas reações de fixação do complemento e neutralização, usando a cêpa de citomegalovírus AD 169

Idade (anos)	Número soros testados	Reação de fixação do complemento		Reação de neutralização	
		N.º	%	N.º	%
15 — 25	68	16	23	28	41
25 — 35	36	21	58	29	80
35 — 45	132	93	70	112	84
Total	236	130	55	169	71

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados obtidos provam que a infecção por citomegalovírus ocorreu com bastante freqüência na população estudada, podendo, possivelmente, inferir-se que semelhante padrão deva ser encontrado numa amostra significativa da população brasileira.

Alguns dos trabalhos feitos no Brasil sobre a ocorrência de células de inclusão citomegálica de localização vária, fornecem resultados que parecem confirmar a elevada freqüência da infecção por citomegalovírus, entre nós^{3, 4, 6, 9}.

As reações sorológicas fornecem informes da utilidade, particularmente a reação de fixação do complemento. Nas infecções ocasionadas por citomegalovírus a resposta em anticorpos fixadores do complemento não é transitória, ao contrário do que sucede em muitas outras viroses. Tal persistência sugere que o citomegalovírus, após o estabelecimento de uma infecção primária, permanece no organismo em estado de latência. Se os casos de doença em adulto constituem complicações de doenças depressoras dos mecanismos de imunidade ou de uma infecção exógena, ou se se trata de processos de reativação intermitente, ainda não é possível definir. Os inquéritos sorológicos feitos no Brasil compreendem o de

VERONESI³⁴ que encontrou em crianças de 0 a 4 anos de idade, usando a reação de fixação do complemento, 60% de positivos e o de TREZZA³³ que obteve valores variando entre 8%, para o grupo de 1 a 5 anos e 42%, para o grupo etário de 36 a 40. Os resultados obtidos por este último autor referem-se a anticorpos fixadores do complemento para a cêpa AD 169, a mesma cêpa utilizada em nosso inquérito, detectados, no entanto, por técnica diferente da que utilizamos, o que pode explicar as diferenças entre nossos resultados e os de TREZZA³³.

A comparação dos resultados obtidos por diversos autores tem, obviamente, um interesse muito relativo, dado que, muitas vezes, são diferentes os grupos populacionais estudados, tanto em suas características raciais, como sócio-econômicas, como diferentes são os critérios utilizados para a determinação dos níveis mínimos de anticorpos significativos, ou as técnicas de reação sorológica utilizada nos levantamentos epidemiológicos. Nossos resultados diferem sensivelmente dos obtidos em outros inquéritos^{7, 18, 26, 30, 32, 33}, mas não devemos deixar de levar em conta as considerações feitas, ao tentar conferir-lhes o seu devido significado. Deve ainda referir-se a utilização de cêpas homotípicas ou heterotípicas, como elemento capaz de condicionar aquelas

diferenças. CARLSTROM⁷, MONTPLAISIR²⁶ e TREZZA³³, tal como nós, usaram uma cêpa heterotípica, a cêpa americana AD 169; JACK & McAULIFFE¹⁸ selecionaram a cêpa hemotípica RCH 234, isolada na Austrália da urina de uma criança congenitamente infectada; ROWE et al.³⁰ usaram a cêpa AD 169, neste caso, uma cêpa homotípica, visto ter sido isolada na área de Washington, onde o inquérito foi feito; finalmente STERN & ELEK³² utilizaram a cêpa americana Kerr em seu inquérito feito na área de Londres. Mesmo considerando os citomegalovírus como membros de um grupo de vírus não homogêneo, ainda que antigenicamente relacionados²⁹, o fato de as diferentes cêpas possuírem um antígeno fixador de complemento comum, faz prever que os resultados por nós obtidos não devem diferir muito dos que possam obter-se com uma cêpa isolada localmente. A existência de uma boa correlação entre os anticorpos fixadores do complemento e anticorpos neutralizantes (Tabela 2), fato já evidenciado anteriormente⁷, parece confirmar esta hipótese.

Além de variações de ordem metodológica também as múltiplas condições sócio-econômicas regionais podem estar condicionando as diferenças de prevalência observadas. A precariedade de con-

dições de vida de determinadas populações parecem, em alguns inquéritos, explicar as elevadas porcentagens de positividade encontradas²⁴, enquanto noutros ela parece adquirir uma importância secundária^{25, 27}. No presente estudo também elementos desta natureza poderão estar condicionando as porcentagens de positividade que obtivemos para cada um dos grupos etários, porém, não tendo nossa amostra sido analisada em termos sócio-econômicos, torna-se impossível adiantar quaisquer conclusões.

A distribuição das porcentagens de positividade segundo o sexo, por nós obtida, parece contribuir para reforçar as discordâncias existentes a este respeito na literatura. Em alguns trabalhos^{12, 15} aquelas diferenças de positividade mostram-se significativas, enquanto noutros^{26, 32}, tal como no nosso estudo, não se encontram valores significativamente diferentes em um e outro grupo.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Edwin H. Lenette, Chefe dos Laboratórios Biomédicos do Departamento de Saúde do Estado da Califórnia, Berkeley, pela linhagem celular HDFL e pela cêpa AD 169 de citomegalovírus, com os quais realizamos a presente pesquisa.

RSPU-B/221

CANDEIAS, J. A. N. et al. — [Serological study of cytomegalovirus infections.]
Rev. Saúde públ., S. Paulo, 8:257-63, 1974

SUMMARY: *The age and sex distribution of complement-fixing antibodies was studied in a sample of 1294 sera from adults and children of S. Paulo city, Brazil. The incidence of 33% by 15 years of age, with a maximum of 70% reached in the older age group (≥ 35 years), support the findings in other countries. An analysis of sera in terms of sex showed no significant differences in the distribution of complement-fixing antibodies to CMV. A comparative age distribution of CMV complement-fixing and neutralizing antibodies in a sample of 236 sera, using the AD 169 strain, confirmed the high correlation between these types of antibodies, being the per cent of positive sera consistently higher for neutralizing antibodies.*

UNITERMS: *Cytomegalovirus infections*; Serological study*; Complement-fixing antibodies*.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTSHULER, G. & McADAMS, A. J. — Cytomegalic inclusion disease of a nineteen week fetus. Case report including a study of the placenta. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 111:295-8, 1971.
2. ANDERSEN, H. K. & SPENCER, E. S. — Cytomegalovirus infection among renal allograft recipients. *Acta med. scand.*, 186:7-19, 1969.
3. BARBOSA, L. T. et al. — Doença citomegálica de inclusão. *An. Nestlé*, 58:4-45, 1959.
4. BASTOS, H. D. et al. — Doença de inclusão citomegálica. *Pediat. prat.*, 43:5-26, 1972.
5. BENYESH-MELNICK, M. — Human cytomegalovirus. In: BLAIR, J. E. et al. (ed.) *Manual of clinical microbiology*. Bethesda, Md., Williams & Wilkins Co., 1970. p. 568-75.
6. BRITO, T. & MILANESI, M. L. — Incidência da doença de inclusão citomegálica em necrópsias de rotina. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 6: 119-22, 1964.
7. CARLSTROM, G. — Virologic studies on cytomegalic inclusion disease. *Acta paediat. scand.*, 54:17-23, 1965.
8. DREESMAN, G. R. & BENYESH-MELNICK, M. — Spectrum of human cytomegalovirus complement-fixing antigens. *J. Immunol.*, 99:1106-14, 1967.
9. FARIA, L. de — Citomegalia em crianças. Primeiros casos registrados no Brasil. *Rev. paul. Med.*, 50:153-60, 1957.
10. FELDMAN, R. A. — Cytomegalovirus infection during pregnancy. *Amer. J. Dis. Child.*, 117:517-21, 1969.
11. FUCCILLO, D. A. et al. — Micro indirect hemagglutination test for cytomegalovirus. *Appl. Microbiol.*, 21: 104-7, 1971.
12. GOLUBJATNIKOV, R. et al. — Prevalence of antibodies to Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and toxoplasma in a Mexican high-land community. *Amer. J. Epidemiol.*, 97:116-24, 1973.
13. HANSHAW, J. B. — Congenital cytomegalovirus infection: laboratory methods of detection. *J. Pediat.*, 75:1179-85, 1969.
14. HANSHAW, J. B. — Developmental abnormalities associated with congenital cytomegalovirus infection. *Adv. Terat.*, 4:64-93, 1970.
15. HENNEBERG, G. & ANTONIADIS, G. — Serological investigations on the incidence of complement-fixing antibodies to cytomegalovirus in West-berlin. *Zentralbl. Bakteriol.*, 213: 416-27, 1970.
16. HENSON, D. — Cytomegalovirus inclusion bodies in the gastrointestinal tract. *Arch. Pathol.*, 93:477-82, 1972.
17. HENSON, D. et al. — Cytomegalovirus infections during acute childhood leukemia. *J. Infect. Dis.*, 126:469-81, 1972.
18. JACK, I. & McAULIFFE, K. C. — Sero-epidemiological study of cytomegalovirus infections in Melbourne children and some adults. *Med. J. Austr.*, 1:206-9, 1968.
19. LANGENHUYSEN, M. et al. — Demonstration of IgM cytomegalovirus antibodies as an aid to early diagnosis in adults. *Clin. Exp. Immunol.*, 6: 387-9, 1970.
20. LANG, D. J. et al. — Association of cytomegalovirus infection with the postperfusion syndrome. *New Eng. J. Med.*, 278:1147-9, 1968.
21. McGRACKEN Jr., G. H. et al. — Congenital cytomegalic inclusion disease. *Amer. J. Dis. Child.*, 117:522-39, 1969.
22. MEDEARIS, D. N. et al. — Cytomegalovirus infection of the female genital tract. *Pediat. Res.*, 4:461, 1970.
23. MITCHELL, R. M. — Cytomegalovirus mononucleosis following renal hemodialysis. *Med. J. Austr.*, 2:1103-8, 1968.

24. MONIF, G. R. G. et al. — Prevalence of complement-fixing antibodies to cytomegalovirus in a semirural southern county. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 108:372-4, 1970.
25. MONTGOMERY, R. et al. — Recovery of cytomegalovirus from the cervix in pregnancy. *Pediatrics*, 49:524-31, 1972.
26. MONTPLAISIS, S. & MARTINEAU, B. — Infection causée par le virus cytomégalique dans la région de Montréal: étude épidémiologique. *Can. J. public Hlth*, 63:333-41, 1972.
27. NUMAZAKI, Y. et al. — Primary infection with human cytomegalovirus: virus isolation from health infants and pregnant women. *Amer. J. Epidemiol.*, 91:410-7, 1970.
28. PENTTINEN, K. et al. — Cytomegalovirus antibody assay by platelet aggregation. *Arch Gesamte Virusforsch*, 29:189-94, 1970 apud WELLER, T. H., 1971.
29. PLUMMER, G. — Cytomegalovirus of man and animals. In: MELNICK, J. L. (ed.) *Progress in medical virology*. Basel, S. Karger, 1973. p. 92-125.
30. ROWE, W. P. et al. — Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from cultures of human adenoids. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 92:418-24, 1956.
31. STERN, H. — Isolation of cytomegalovirus and clinical manifestation of infection at different ages. *Brit. med. J.*, 1:665-9, 1968.
32. STERN, H. & ELEK, S. D. — The incidence of infection with cytomegalovirus in a normal population. A serological study in Greater London. *J. Hyg., Camb.*, 63:79-87, 1965.
33. TREZZA, E. M. C. — Estudo soro-epidemiológico da infecção pelo citomegalovírus. Botucatu, 1973. [Tese de doutoramento — Faculdade Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu]
34. VERONESI, R. — Citomegalia: revelação da presença do "vírus das glândulas salivares" em crianças de São Paulo através de inquérito sorológico. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo*, 14:249-55, 1959.
35. WELLER, T. H. — The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. *N. Engl. J. Med.*, 285:203-14, 1971.

Recebido para publicação em 10-6-1974

Aprovado para publicação em 9-8-1974