



# OS VÍRUS COMO CAUSA DE IRA ALTA E BAIXA EM CRIANÇAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS E DIAGNÓSTICO

*Professora Mercedes C. Weissenbacher e Dra. María M. Ávila*

## I. INTRODUÇÃO

**A**s infecções respiratórias agudas (IRA) do trato respiratório inferior são uma das principais causas de mortalidade de crianças no mundo, particularmente nos países em desenvolvimento, causando aproximadamente um terço de todas as mortes estimadas em crianças menores de 5 anos (1).

Entre os numerosos agentes etiológicos descritos, os vírus são reconhecidos como os agentes etiológicos predominantes nas IRA (2), tanto em crianças quanto em adultos, seja em países em desenvolvimento ou nos países industrializados (3).

Ainda que se postulasse que nos países em vias de desenvolvimento a etiologia bacteriana era a predominante nas IRA (4), em um estudo multicêntrico internacional coordenado pelo *Board on Sciences and Technology for International Development* da *National Academy of Sciences* dos Estados Unidos, determinou-se que a etiologia viral está presente em maior proporção que a bacteriana (5), variando as porcentagens de identificação viral segundo o país entre 17 e 44% das IRA em crianças menores de 5 anos. Os vírus isolados mais frequentemente foram o vírus sincicial respiratório (VSR), entre 11 e 37% do total dos casos estudados; o adenovírus, entre 1 e 7%, os parainfluenza 1 e 3, entre 1 e 11%; e os influenza A e B, entre 1,4 e 4,3% (6-9).

Demonstrou-se que o mesmo quadro clínico pode ser causado por diferentes agentes e o mesmo agente é capaz de causar uma ampla gama de síndromes. Os vírus mais comuns nas IRA altas são os rino e corona; e nas IRA baixas os influenza, parainfluenza, VSR e adenovírus (Quadro

1). No entanto, outros vírus além dos mencionados podem causar afecções respiratórias altas ou baixas em crianças; entre eles pode-se mencionar o *Herpes simplex*, o Epstein-Barr (EBV), o vírus do sarampo e o da parotidite. A infecção viral pode causar por si mesma uma doença leve ou grave ou pode complicar-se favorecendo uma posterior infecção bacteriana (10). A pneumonia viral é mais comum que a pneumonia bacteriana, mas o risco de morte é consideravelmente menor (11).

## II. DIAGNÓSTICO DAS IRA VIRAIS

O diagnóstico etiológico das infecções respiratórias virais é feito tradicionalmente mediante a detecção do agente etiológico durante a doença ou pela determinação de um aumento do título de anticorpos durante a convalescência. Tal diagnóstico é complexo devido à grande variedade de agentes que causam as IRA, mas foi simplificado grandemente com as metodologias existentes para a detecção direta do vírus no aspirado nasofaríngeo (12).

O isolamento em culturas celulares mais a identificação por técnicas imunológicas é considerado o método de eleição ou padrão para o diagnóstico virológico. Entretanto, é um método custoso e relativamente lento (às vezes leva mais de uma semana). Um encurtamento do tempo de obtenção de resultados da cultura viral foi obtido com a centrifugação a baixa velocidade das culturas celulares inoculadas com a amostra mais a identificação posterior por imunofluorescência.

A tecnologia tem avançado rapidamente no que concerne ao diagnóstico das infecções respiratórias virais, ainda mais que para as bacterianas, conduzindo ao desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico viral suficientemente rápidas, sensíveis e específicas. Além disso, como resultado do desenvolvimento de quimioterápicos antivirais como a amantadina contra influenza, o ribavirin contra o VSR e outros que estão em teste, faz-se cada dia mais necessário um diagnóstico etiológico acertado e rápido para o manejo do paciente.

Nos últimos anos foram desenvolvidos métodos de diagnóstico direto que permitem detectar em poucas horas a presença de vírus em amostras clínicas. Estes procedimentos são a imunofluorescência (IF), tanto direta como indireta; o imunoensaio enzimático (ELISA) de similar sensibilidade; o imunofluoroensaio de resolução por tempo (TR-FIA); a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a hibridação de ácidos nucleicos. Estes métodos podem dar um diagnóstico entre as 4 e 24 horas posteriores à extração da amostra.

Os métodos sorológicos de detecção de anticorpos antivirais não são os de eleição para o diagnóstico de infecções respiratórias devido à sua baixa sensibilidade e ao fato de que a resposta imune-humoral a estes vírus que não produzem viremia é, no geral, de escassa magnitude. Por outro lado, a necessidade de usar amostras pareadas de soro (ou seja, amostras do período agudo e do período de convalescência) faz com que o resultado não influa no controle terapêutico do paciente. De toda maneira, o diagnóstico sorológico é útil em estudos epidemiológicos, na avaliação de vacinas e em ensaios clínicos de novos antivirais, nos quais é importante detectar tanto infecções clínicas como subclínicas. Em geral, a técnica ELISA para detectar anticorpos IgG em soros pareados é um método sorológico mais sensível para diagnosticar as IRA de origem viral.

### **a) Amostras clínicas para o diagnóstico**

Para a obtenção de um diagnóstico acertado, é essencial a seleção adequada da amostra e sua correta extração, envio, conservação e processamento. Dado que a duração da excreção do vírus costuma ser breve, é importante recolher as amostras nos primeiros dias da doença. Uma amostra tardia pode levar a um resultado falso-negativo. Por outro lado, devido à relativa frequência das infecções contraídas no hospital com estes vírus, a amostra no paciente hospitalizado deve ser obtida no momento da admissão, a fim de evitar o dilema de atribuir o vírus encontrado à doença que originou a hospitalização ou a uma infecção nosocomial.

O aspirado nasofaríngeo (ANF) é a amostra de eleição para identificação dos vírus causadores das IRA, já que provê um número apropriado de células infectadas. Os ANF são obtidos introduzindo uma sonda estéril nas fossas nasais do paciente, e usando uma bomba de vácuo ou seringa para realizar a aspiração da secreção nasofaríngea, que é colocada em um tubo cônico estéril. A amostra, fechada hermeticamente e em banho de gelo, é enviada ao laboratório de virologia para seu processamento. Não deve ser congelada.

Outras amostras que podem ser utilizadas são os lavados bronco-alveolares, nasais ou faríngeos. Os raspados geralmente contêm menor número de células, o que os torna pouco apropriados para o diagnóstico. Ainda assim, pode-se utilizar em conjunto o raspado de fauces e o raspado nasal e desta maneira aumentar o seu rendimento.

### **b) Processamento das amostras**

O objetivo de um bom processamento das amostras é otimizar o isolamento ou a identificação de qualquer vírus presente nas mesmas (Figura 1). Em primeiro lugar, procede-se a uma desagregação cuidadosa do muco. Para a detecção de antígenos virais pelo método ELISA ou de ácidos nucleicos virais pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ou hibridação molecular, é conveniente a utilização do ANF sem centrifugar. Para detecção do vírus por imunofluorescência indireta (IF) ou por isolamento por culturas celulares, centrifuga-se a amostra a 4° C durante 10 a 15 minutos a 3.000 g (3.000 vezes a gravidade). O sobrenadante é utilizado para o isolamento viral em cultura de células. Por outro lado, as células no sedimento são lavadas e depositadas sobre porta-objetos que são fixados em acetona fria por 10 minutos e processados para IF.

A seguir, descrevem-se brevemente, em separado, os métodos mencionados para a identificação dos vírus que causam as IRA altas e baixas nas crianças.

#### **b.1) Isolamento em culturas celulares**

O uso deste método é recomendado quando está disponível no laboratório, já que é o método de eleição quando os possíveis agentes etiológicos são diversos vírus. As amostras devem ser mantidas entre 4° e 6° C, sem congelar. O material residual deve ser guardado fracionado a -70° C ou menos no caso em que se tenha que usar a amostra original de novo.

Como se observa na figura 1, a técnica consiste em inocular uma alíquota<sup>1</sup> de 0,2 ml do sobrenadante do ANF nos distintos cultivos celulares em monocapa, os quais se tenha extraído previamente o meio de crescimento. Depois da inoculação, agrega-se o meio de conservação (sem soro fetal bovino e com agregado de tripsina nas células sensíveis ao crescimento de vírus influenza e parainfluenza) e incubam-se entre 34° e 35° C. As culturas devem ser observadas diariamente durante 11 dias para detectar o aparecimento de ação citopática (ACP) sobre a monocapa. Entre quatro a sete dias depois da infecção, para a detecção de vírus influenza e parainfluenza, realiza-se sobre culturas específicas (MDCK, LLC-MK2 e outras), uma hemadsorção (Had) com glóbulos vermelhos de cobaias. Aquelas culturas nas quais se observa ACP e/ou Had são processadas para a identificação do vírus por meio de IF. As culturas celulares primárias ou linhagens estabelecidas que permitem o isolamento dos distintos vírus respiratórios são numerosas e serão mencionadas mais adiante na descrição de cada vírus.

Obteve-se um aumento na infectividade viral e um encurtamento do tempo de obtenção dos resultados com a centrifugação a baixa velocidade das culturas celulares inoculadas com a amostra do paciente, o que aumenta a sensibilidade da cultura. Depois de uma incubação curta a fim de permitir a replicação, realiza-se o tingimento por IF para a identificação do agente viral presente. A combinação de ambas as técnicas demonstrou ter uma especificidade e sensibilidade equivalentes ao isolamento tradicional em culturas celulares em tubos, com uma redução no tempo de 10 para dois ou três dias (13-17).

## **b.2) Imunofluorescência (IF)**

A IF, tanto direta quanto indireta, é uma técnica simples que permite a rápida identificação de numerosos vírus. Na prova direta, o soro antivírus específico é marcado com fluoresceína. Na prova indireta, faz-se reagir um soro específico contra o antígeno do vírus a detectar (produzido em animais) e logo se agrega um anticorpo dirigido contra a imunoglobulina da espécie animal empregada no passo anterior, marcado com fluoresceína.

A OMS coordenou estudos multicêntricos para o desenvolvimento e a utilização de anticorpos monoclonais no diagnóstico de IRA virais por IF. Foram realizados ensaios com kits de diagnóstico de IF em 16 laboratórios diferentes que demonstraram sua eficácia (18).

Atualmente, é possível obter os anti-soros específicos, policlonais ou monoclonais, para a identificação da maioria dos vírus respiratórios (19). Já foi demonstrado que as misturas de anticorpos monoclonais têm alta sensibilidade e especificidade para identificar antígenos virais em amostras clínicas, comparável a qualquer método de referência. Pode-se esperar uma perda mínima de sensibilidade quando são comparados com anticorpos policlonais de alta qualidade, mas os monoclonais permitem uma leitura mais simples e de qualidade muito superior (18).

---

<sup>1</sup> Uma parte ou proporção de algo.

### **b.3) Ensaio imunoenzimático (ELISA)**

Os métodos imunoenzimáticos para a identificação de vírus respiratórios têm sido desenvolvidos nos últimos anos com resultados variados e são utilizados para a detecção de antígenos em amostras clínicas. Emprega-se o princípio do sanduíche, agregando-se as amostras a tubos ou placas de plástico especial nos quais se fixou o anticorpo de “captura”, dirigido contra o antígeno que se busca. Em seguida agrega-se outro anticorpo específico contra o antígeno, mas marcado com uma enzima (as mais usadas são a peroxidase e a fosfatase alcaline). A atividade enzimática é detectada ao agregar o substrato, por uma mudança de coloração que pode ser lida visualmente ou com um leitor de ELISA. Os anticorpos monoclonais melhoraram a sensibilidade e especificidade destes métodos e contribuíram para difundir o uso do ELISA como método de diagnóstico (20-23). Este método também pode ser utilizado para a detecção de anticorpos no soro.

### **b.4) Hibridação com sondas**

Um enfoque diagnóstico mais recente está dirigido à detecção de genomas virais por hibridação com sondas de ácidos nucleicos específicos para a detecção de vírus. A sonda marcada é aplicada à amostra clínica e se existe uma cadeia complementar de ácido nucleico viral ocorre a hibridação que é detectada segundo o sistema de marcação empregado (sondas radioativas ou biotinizadas). Estas sondas podem ser preparadas por diferentes métodos que dependem fundamentalmente do vírus a ser investigado. Nos últimos tempos a tendência tem sido utilizar clones de ácidos nucleicos recombinantes ou oligonucleotídeos sintéticos que representem seqüências específicas do genoma viral de interesse (3, 24, 25).

### **b.5) Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Este método permite detectar quantidades muito pequenas de vírus, mediante a amplificação de seqüências do ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico viral presente na amostra. O processo requer o uso de oligonucleotídeos complementares de seqüências genômicas conservadas do vírus denominadas *primers* e de uma enzima DNA polimerase termoestável. Como resultado da reação, são obtidas milhões de cópias a partir de uma única seqüência do DNA viral que logo podem ser detectadas a olho nu (por meio do tingimento com brometo de etídio) ou por meio de hibridação (radioativa ou enzimática). A utilização da mesma ainda é experimental, especialmente para o vírus da influenza, o VSR e o enterovírus (3).

### **b.6) Imunofluoroensaio de resolução por tempo (TR-FIA)**

Este método, desenvolvido recentemente para a detecção de vírus respiratórios, é até o momento o ensaio em fase sólida mais sensível. Permitiu aumentar a sensibilidade da fluorescência ao eliminar a fluorescência inespecífica de fundo e conseguir uma

fluorescência de maior intensidade e tempo de queda com o uso de quelato de európio. Sua simplicidade e rapidez derivam do fato de que a amostra é incubada simultaneamente durante apenas uma hora, com o anticorpo de captura e o anticorpo específico marcado com o quelato de európio. O alto custo do equipamento requerido limitou seu uso aos laboratórios de referência (3).

### III. VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (VSR)

Vírus da família *Paramixoviridae*, do gênero pneumovírus. O virião é pelomórfico, tem invólucro e seu diâmetro varia entre 150 e 300 nm (26). O ácido nucléico do VSR é uma cadeia simples de RNA de polaridade negativa. Não possui atividade de hemaglutinação, nem de hemadsorção, hemolítica ou neuraminidase. É muito sensível às mudanças de temperatura, o que deve ser levado em conta quando se pretende isolá-lo em culturas celulares. Até o momento, existe a descrição de um sorotipo de VSR e pelo menos duas variantes antigênicas ou subgrupos (A ou 1 e B ou 2). A maior diferença entre os subgrupos reside na glicoproteína G. Ambos circulam simultaneamente na população e não está clara a importância clínica ou epidemiológica destas variantes antigênicas (27-29). É provável que a diversidade antigênica dos dois subgrupos de VSR tenham alguma influência na susceptibilidade das crianças à infecção seqüencial com os mesmos. Em alguns países foram demonstrados recentemente padrões epidêmicos que alternam os subgrupos A e B em ciclos de 2 anos (3).

O período de incubação da doença respiratória é de quatro a cinco dias. O vírus se replica na nasofaringe e pode permanecer até três semanas na criança infectada. O mecanismo pelo qual o vírus se estende desde as vias altas ao trato respiratório poderia ser através do epitélio respiratório ou pela aspiração das secreções infectadas. Até agora, não se detectou viremia (26). Parece ser necessário um sistema imunológico intacto para se terminar com a infecção, apesar de que a infecção em crianças possa ocorrer inclusive na presença de anticorpos maternos. São comuns as reinfecções em todas as idades, ocorrendo algumas vezes a poucas semanas uma da outra (30).

Encontrou-se evidência da infecção por VSR em todas as áreas geográficas estudadas. Epidemias anuais ocorrem comumente durante os meses frios. Durante as epidemias há um aumento do número de casos de bronquiolites e pneumonias e um aumento de internação de crianças pequenas por infecção de vias respiratórias baixas. Antes de começar a etapa escolar (entre os 4 e 5 anos), a maioria das crianças já se infectou com VSR. A idade, o sexo e as condições socioeconômicas influem na gravidade da doença, mas não na taxa de ataque.

A bronquiolite é a entidade mais comum causada por este vírus, sendo mais freqüente entre as 6 semanas e os 6 meses de idade. Esta doença é pouco freqüente durante as primeiras 6 semanas de vida (31). A infecção primária com o VSR pode se manifestar como uma infecção respiratória baixa, como pneumonia, bronquiolite, traqueobronquite ou infecção respiratória alta muitas vezes acompanhada por febre ou otite média. A infecção é raras vezes assintomática. A pneumonia e bronquiolite podem ser difíceis de diferenciar e muitos lactentes parecem ter ambas as síndromes (32). O VSR causa epidemias que afetam a uma proporção muito alta de crianças, algumas das

quais devem ser hospitalizadas. Estas crianças excretam altos títulos de vírus durante vários dias, o que provoca freqüentes infecções nosocomiais, especialmente em alas de lactentes. Estas infecções podem manifestar-se desde a forma de doença febril leve das vias aéreas altas, até um quadro com grave comprometimento respiratório baixo e morte subsequente (32). Em adultos infectados com VSR, a doença pode manifestar-se em vias aéreas altas ou baixas e nos idosos pode causar broncopneumonias.

O VSR cresce em uma grande variedade de células de origem humana e animal. As linhagens nas quais se pode isolar o VSR são Hep-2, Hela, Vero, LLC-MK2, MRC-5, BSC-1 e CV-1 e também em culturas primárias de rim bovino ou de rim de embrião humano. O vírus induz à formação de sincícios característicos em células Hep-2 (23, 26).

A imunofluorescência direta e indireta com anticorpos poli ou monoclonais demonstrou ser de grande utilidade para a detecção de antígenos do vírus nas células de descamação naso-faríngea (17, 18, 33).

O método ELISA permitiu identificar amostras positivas, demonstrando uma eficiência semelhante à da imunofluorescência. Esta prova pode detectar entre 20 e 30 ng de proteína viral (20). Atualmente, existem kits comerciais que, ao serem avaliados deram valores distintos de sensibilidade e especificidade (21, 23). Realizam-se ensaios utilizando a reação em cadeia da polimerase e sondas de ácidos nucleicos para detectar VSR em amostras clínicas, assim como a detecção da nucleoproteína viral mediante a aplicação de anticorpos monoclonais com a técnica TR-FIA (3).

#### **IV. ADENOVÍRUS**

A família *Adenoviridae* compreende um grande número de espécies de origem humana e animal que estão amplamente distribuídas na natureza. A classificação atual agrupou os numerosos membros da família em dois gêneros: mastadenovírus e aviadenovírus. O gênero mastadenovírus inclui os adenovírus humanos e muitos outros isolados de diversos animais. Todos eles caracterizam-se por serem específicos de sua espécie hospede e por apresentarem uma grande variabilidade genética. Em geral, infectam a seus hospedes através da conjuntiva ocular ou da mucosa digestiva. Até o presente foram reconhecidas 47 espécies ou sorotipos diferentes de adenovírus humanos (34).

Desde seu descobrimento por Rowe em 1953 (35), foram utilizados distintos critérios para a classificação destes agentes, ficando agrupados finalmente em seis subgêneros (do A ao F). Todos os adenovírus apresentam a mesma estrutura geral: partículas virais de simetria icosaédrica, sem envólucro e com um diâmetro médio de 80 nm. O genoma viral é o DNA bicatenário. A replicação do DNA e a transcrição e amadurecimento dos adenovírus realizam-se no núcleo celular, dentro do qual ocorre um acúmulo de proteínas estruturais “em corpos de inclusão”, característicos em células alveolares durante as pneumonias por adenovírus (36, 37).

Os adenovírus encontram-se distribuídos em todo o mundo. Os diferentes sorotipos causam doença em diferentes grupos de idade e a gravidade varia segundo a área geográfica. As infecções são em geral autolimitantes e as características clínicas da doença dependem tanto do hospede

como do sorotipo envolvido. Aproximadamente 65% dos isolamentos de adenovírus provêm de crianças menores de 4 anos (36, 38).

Os adenovírus são responsáveis por 5% dos casos de infecção respiratória em crianças menores de 4 anos de idade e por 10% das infecções respiratórias que requerem hospitalização nesse mesmo grupo de idade (37). Podem causar faringite, conjuntivite, laringotraqueobronquite e bronquiolite, mas as pneumonias agudas são, sem sombra de dúvida, as manifestações clínicas mais graves, sobretudo nas crianças pequenas nas quais podem ser fatais (36). Os tipos mais freqüentemente associados a estes quadros são Ad3, Ad4, Ad7 e Ad21, bem como Ad2 e Ad5 (37). Foram descritas seqüelas de dano pulmonar residual importante como bronquiectasia e bronquiolite obliterante (39).

A infecção por certos sorotipos pode causar também uma síndrome clínica “tipo *pertussis*” que não pode ser diferenciada daquela de etiologia bacteriana, salvo mediante a detecção do agente viral ou bacteriano (40).

Estes sorotipos representam um problema cada vez mais freqüente nos hóspedes com o sistema imune comprometido. Ultimamente, foram descritos 5 novos sorotipos, do 42 ao 47, associados a casos de AIDS (34).

Os adenovírus são vírus estáveis que podem ser recuperados de amostras clínicas com relativa facilidade. O aspirado nasofaríngeo, os raspados nasais e o material de biópsia ou necrópsia, são amostras adequadas para seu isolamento. A recuperação do vírus pode ser considerada um sinal de infecção recente e está freqüentemente associada a doença sintomática.

As culturas primárias, as linhagens diplóides e as linhagens contínuas de células humanas (células A-549, Hep-2, HeLa, Kb), podem ser empregadas para diagnosticar a infecção com adenovírus, produzindo um efeito citopático característico com arredondamento e agrupamento celular em cachos e formação de corpos de inclusão intranucleares (37). A identificação do isolamento pode ser feita por imunofluorescência.

A detecção de genomas virais por hibridação com sondas de ácidos nucléicos específicos é uma técnica que se usa atualmente para o diagnóstico de adenovírus (24, 25).

Um aumento de 4 vezes ou mais do título de anticorpos entre uma amostra de período agudo e outra de convalescência por fixação de complemento ou ELISA, é um sinal significativo da presença da infecção por adenovírus. Atualmente, considera-se o ELISA superior para a detecção da resposta imune em crianças (37).

## V. VIRUS PARAINFLUENZA

Os vírus parainfluenza são classificados dentro do gênero *paramyxovirus*, família *Paramyxoviridae*. São vírus que contêm RNA em um nucleocapsídeo com invólucro que deriva da membrana da célula hospede. São pleomórficos, de 100 a 200 nm, com espículas que têm funções de hemaglutinina e neuroaminidase (proteína HN), atividades que não podem ser separadas. Possuem também outras espículas responsáveis pela ação hemolítica e de fusão

(proteína F), o que os torna capazes de fundir células e hemolisar certos tipos de eritrócitos (41), o que os diferencia dos vírus influenza.

Foram identificados os tipos 1, 2, 3 e 4. Estes vírus podem ser reconhecidos pela ação citopática nas células infectadas ou pelas reações de hemadsorção com glóbulos vermelhos de cobaias em monocapas de células infectadas.

Estes vírus causam infecções respiratórias frequentes e de gravidade variável, que dependem do tipo de vírus e sobretudo da idade do hospede, em relação direta com a produção de primoinfecções ou reinfeções. Os tipos 1, 2 e 3 são reconhecidos como os principais agentes causais do crupe, ainda que possam causar também pneumonias e bronquiolites (42).

Os vírus parainfluenza, especialmente os tipos 1 e 2 são responsáveis por mais de 50% dos casos de crupe ou laringite obstrutiva. As bronquiolites associadas ao tipo 3 podem apresentar-se a partir do primeiro mês de vida, ocorrem durante todo o ano e aparecem em surtos epidêmicos. Os vírus parainfluenza têm uma distribuição geográfica mundial. Em geral, a doença que causam é leve. Os quatro tipos são capazes de causar infecções respiratórias tendo-se demonstrado reinfeções em adultos e crianças, causadas principalmente pelo sorotipo 3. Estes agentes geralmente infectam a indivíduos de pouca idade. Os tipos 1 e 2 causam epidemias no outono. O tipo 3 causa doença durante todo o ano. Em um estudo sorológico indica-se que 60% das crianças se infecta por parainfluenza 3 no transcurso dos 2 primeiros anos de vida e aproximadamente 80% se infecta antes dos 4 anos, a maioria de forma assintomática (43). A alta taxa de infecção sugere uma disseminação rápida. Podem causar doença grave em lactentes como faz o VSR, mas essa gravidade diminui a partir dos 3 anos (44). É pouco freqüente uma doença tão grave que requeira internação hospitalar (42).

De maneira geral a excreção de vírus é de curta duração, motivo pelo qual estes vírus devem ser isolados de aspirados traqueais ou nasofaríngeos colhidos precocemente. A amostra clínica é inoculada em diferentes linhagens celulares, especialmente linhagens primárias de rim de macaco (ainda que também possam ser usadas linhagens estabelecidas LLC-MK2 ou MDCK), mantendo as células em meio livre de soro. Algumas vezes podem apresentar efeito citopático e em outras é preciso reconhecer a presença viral nas culturas com provas de hemadsorção (Had), com eritrócitos de cobaia a 4° C (45). A identificação do vírus pode ser realizada por IF, inibição da hemadsorção ou neutralização com antisoros específicos.

A técnica de IF é aplicada com êxito para a detecção do antígeno viral em células nasofaríngeas (33, 46). A reação cruzada entre os distintos tipos deste vírus e o das caxumbas é freqüente e complica o diagnóstico sorológico, tanto por inibição da hemaglutinação como por fixação do complemento.

## VI. VÍRUS INFLUENZA

Os vírus influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae* e ao gênero influenza vírus. Determinantes antigênicos específicos permitem diferenciar 3 tipos: A, B e C, os quais podem causar doença respiratória aguda.

O virião é filamentososo ou esférico, de 80 a 120 nm, com um invólucro de dupla capa lipídica

derivada da célula hospede modificada pela presença de projeções em forma de espículas que são as glicoproteínas hemaglutininas (HA) e a neuroaminidase (NA).

O nucleocapsídeo é de simetria helicoidal constituída de 8 fragmentos de RNA monocatenário associados à nucleoproteína e a 3 polimerases. A estrutura segmentada do ácido nucléico explica a labilidade genética e a facilidade com que ocorrem os reagrupamentos genômicos nestes vírus. Os vírus influenza A e B estão distribuídos amplamente e são sazonais em climas temperados. O vírus tipo A foi isolado em 1933 e o tipo B em 1940, ainda que haja evidências de epidemias causadas por este agente há 200 anos (47).

A infecção se apresenta em forma de epidemias explosivas e com uma disseminação rápida do vírus em uma região geográfica. A causa fundamental da ocorrência das epidemias de influenza é a contínua aparição de novas cepas antagonicamente diferentes, derivadas de cepas anteriores, que desconhecem a imunidade dos indivíduos e causam doença em pessoas de todas as idades. Estas variações antigênicas são mais freqüentes na influenza A. Durante alguns anos, estas epidemias são causadas predominantemente por um tipo de vírus, mas é freqüente que circule mais de um tipo, seja de forma simultânea ou em seqüência.

O vírus da influenza apresenta dois padrões de disseminação diferenciáveis. Um representado por uma mudança antigênica maior (antigenic shift) que ocorre quando aparece um subtipo antigênico novo ou que não tenha circulado por muitos anos, induz pandemias por influenza A a intervalos irregulares e imprevisíveis. Calcula-se que em 1918 morreram aproximadamente 20 milhões de pessoas em todo o mundo, por causa de infecção por um vírus tipo A que se acredita ter sido o subtipo H1n1. As pandemias melhor documentadas aconteceram em 1918, 1957, 1968 e 1977.

O outro padrão de disseminação é devido a uma tendência ou variação antigênica menor (antigenic drift), com mudanças relativamente menores e freqüentes (a cada ano ou a cada pouco anos) em um subtipo de influenza. A evolução dos vírus de influenza não é simples e previsível como se acreditava a princípio; atualmente considera-se que uma “nova” cepa não é, necessariamente, a que causa uma pandemia; já se comprovou, por exemplo, que a cepa A/H1N1 que apareceu em 1977, era geneticamente idêntica a uma que circulou em 1950 (3).

Os vírus influenza A e B podem causar doença respiratória alta e baixa como traqueobronquite ou pneumonia. Muitas vezes a infecção é subclínica ou apresenta-se com sintomas leves. O vírus, que se dissemina de pessoa a pessoa, tem um período de incubação de um a quatro dias. A infecção por influenza C está associada a infecções subclínicas ou resfriados comuns moderados; não causam epidemias e a mortalidade é infreqüente (47).

O diagnóstico do vírus influenza pode ser realizado por inoculações de secreções nasofaríngeas em culturas primárias de células de rim de diversas espécies, ou de pulmão de embriões de galinha, ou ainda em ovos embrionados. Demonstrou-se que o emprego de enzimas proteolíticas, habitualmente de tripsina, pode aumentar a replicação em linhagens contínuas de células como a MDCK (48). Quarenta e oito horas depois de inoculadas as células, é possível detectar a presença

do vírus por hemadsorção com eritrócitos de cobaias (45). Se esta for negativa, o procedimento deve ser repetido 2 vezes por semana. Se o resultado for positivo ou se for observada a ação citopática, a identificação deve ser realizada por IF, com anticorpos específicos. Também pode-se realizar hemaglutinação no sobrenadante.

A detecção do antígeno em células epiteliais por IF é usada há muitos anos, e atualmente é um método empregado comumente (33, 49). A técnica de TR-FIA também vem sendo utilizada com êxito há alguns anos (50).

A técnica de PCR tem sido utilizada para a identificação do vírus de influenza em amostras clínicas (51), assim como para diferenciação dos diferentes tipos do vírus (52).

O diagnóstico sorológico por fixação de complemento ou por inibição da hemaglutinação é útil quando se tem soros pareados, já que a infecção aguda está acompanhada de um aumento importante do título de anticorpos séricos.

## VII. RINOVÍRUS

Os rinovírus pertencem à família *Picornaviridae*. Caracterizam-se por sua susceptibilidade aos ácidos. São conhecidos até o momento 100 imunotipos (53). Têm de 20 a 27nm e contêm quatro proteínas estruturais que formam um capsídeo sem invólucro de simetria icosaédrica. A síntese e maturação do vírus ocorrem no citoplasma.

Constituem a principal causa conhecida do resfriado comum. Infectam somente a seres humanos e primatas superiores e crescem em culturas celulares derivadas destas espécies. A temperatura ótima de replicação é de 33 a 35° C, a temperatura que se encontra no nariz e nas vias respiratórias superiores.

Os rinovírus têm distribuição mundial e tendem a ser epidêmicos no outono e na primavera. Os diferentes tipos antigênicos circulam ao acaso. Os sorotipos atuais são substituídos lentamente por diferentes tipos antigênicos.

As infecções começam na primeira infância e continuam durante toda a vida. As taxas de infecção variam entre uma e duas infecções por pessoa por ano em crianças menores de 1 ano, a 0,7 infecções em adultos. A disseminação ocorre por meio de secreções de mão para mão, ou por intermédio de aerossóis (54). A duração média da doença que habitualmente é leve, é de sete dias.

É pouco freqüente que se solicite um diagnóstico de rinovírus, mas quando é necessário o diagnóstico é feito fundamentalmente por isolamento em células de pulmão embrionário humano (WI-38, MRC5) e em células HeLa. O efeito citopático é característico e aparece entre os dois e os seis dias. A identificação estrita é realizada por demonstração da labilidade aos ácidos (em um pH de 2,9) e por neutralização com anticorpos específicos (realizada em muito poucos laboratórios e raramente se faz necessária). A detecção do genoma viral com técnicas de hibridação de ácidos nucléicos e PCR está sendo atualmente utilizada para estes vírus, nos quais a detecção de antígenos não é possível devido à multiplicidade de sorotipos (55, 3).

## VIII. CORONAVÍRUS

Os coronavírus pertencem à família *Coronaviridae*, gênero coronavírus. São partículas pleomórficas de 80 a 150 nm, com projeções superficiais em forma de pétala que lhes dão o aspecto de uma coroa. São vírus RNA e todos se desenvolvem de forma exclusiva no citoplasma das células infectadas.

Os coronavírus causam resfriados em crianças e adultos. Observou-se que as distintas cepas causam doenças com características semelhantes. O período de incubação é mais prolongado e sua duração mais breve que no caso dos rinovírus, mas os sintomas são similares. Com pouca frequência causam uma doença respiratória baixa mais séria.

Estes vírus encontram-se distribuídos mundialmente, e são mais frequentes no inverno e na primavera. Podem chegar a constituir 35% do total das infecções respiratórias virais das vias aérea superiores em épocas de alta. A reinfeção é comum. A infecção pode ocorrer em qualquer idade, se bem que é mais frequente nas crianças.

Atualmente pode-se aplicar métodos de detecção de antígenos do vírus por imunofluorescência ou ELISA (56). A recuperação do vírus de amostras clínicas é difícil. A cultura é realizada especialmente em tecidos animais. Há algumas cepas que se adaptaram a crescer em culturas de células fibroblásticas diplóides humanas (56).

A forma de diagnóstico mais utilizada até o momento tem sido o aumento de quatro vezes ou mais do título de anticorpos em amostras pareadas, especialmente por fixação de complemento (57).

## IX. VÍRUS ECHO E COXSACKIE

Ambos os vírus pertencem ao gênero enterovírus, família *Picornaviridae*. Compartilham muitas das características morfológicas, estruturais e físico-químicas dos rinovírus. Possuem um capsídeo icosaédrico nu de 20 a 30 nm, com genoma RNA não segmentado. Têm distintas quantidades de sorotipos: 34 no caso dos ECHO; 24 nos Coxsackie A e 6 sorotipos nos Coxsackie B. Todos podem causar doença febril com sintomas respiratórios, e mais de 90% das infecções causadas por este grupo é assintomático. Uma vez infectado o hospede, permanecem presentes no trato respiratório por uma a duas semanas.

Ambos os gêneros, com sua grande variedade de sorotipos, apresentam problemas para o diagnóstico de laboratório. O fato de crescerem muito lentamente em culturas celulares faz com que sua identificação seja complexa.

Em termos gerais, não existem até o momento métodos rápidos acessíveis para detectar os antígenos de todos estes vírus e a sorologia é em geral difícil e custosa (58), motivo pelo qual o diagnóstico destes agentes nas infecções respiratórias agudas não é feito de rotina.

## X. REFERÊNCIAS

1. Gwatkin DR. *How many die? A set of demographic estimates of the annual number of infant and child deaths in the world.* Am J Public Health 1989; 70:1286-89.
2. Organização Pan-Americana da Saúde OPAS/OMS. *Infecciones respiratorias agudas en los niños.* Publicação Científica No. 493, 1985.
3. McIntosh K, Halinen P, Ruuskanen O. *Report of a workshop on respiratory viral infections: epidemiology, diagnosis, treatment and prevention.* Clin Infect Dis 1993; 16:151-64.
4. Pio A, Leowski G, Luelmo F. *Programa de la OMS de infecciones respiratorias agudas en la infancia.* Bol San Panam 1984; 96:283-95.
5. Selwyn B. *The epidemiology of acute respiratory tract infection in young children: Comparison of findings from several developing countries.* Rev Infect Dis 1990; 12:870-88.
6. Avila M, Salomón H, Carballal G et al. *Isolation and identification of viral agents in Argentinean children with acute lower respiratory tract infection.* Rev Infect Dis 1990; 12(supl 8):974-81.
7. Hug F, Rahman M, Nahar N et al. *Acute respiratory tract infection due to virus among hospitalized children in Dhaka, Bangladesh.* Rev Infect Dis 1990; 12( supl 8):982-87.
8. Puthavathana P, Wasi C, Kositanont U et al. *A hospital-based study of acute viral infections of the respiratory tract in Thai children, with emphasis on laboratory diagnosis.* Rev Infect Dis 1990; 12 (supl 8):988-94.
9. Hortal M, Russi JC, Arbiza JR, Canepa E, Chiparelli H, Illarramandi A. *Identification of viruses in a study of acute respiratory tract infection in children from Uruguay.* Rev Infect Dis 1990; 12(supl 8):995-97.
10. Downham, Mars Gardner PS, Mc Quillin J et al. *Role of respiratory viruses in childhood mortality.* Br Med J 1975; 1:235-39.
11. Berman S *Acute respiratory infections.* Infect Dis Clin North Am 1991; 5.
12. Weissenbacher M, Carballal G, Avila M et al. *Etiologic and clinical evaluation of acute lower respiratory tract infections in young Argentinean children: An overview.* Rev Infect Dis 1990. 12(supl 8):889-98.
13. Hudson JB, Misra V, Mosmann TR. *Cytomegalovirus infectivity: analysis of the phenomenon of centrifugal enhancement of infectivity.* Virology 1976; 72:235-43.
14. West PGB, Aldrich R, Hartwig R, and Haller GJ. *Increased detection rate for varicella-zoster virus with combination of two techniques.* J Clin Microbiol 1988; 26:2680-81.
15. Matthey S, Nicholson D, Ruhs S et al. *Rapid detection of respiratory viruses by shell vial culture and direct staining by using pooled and individual monoclonal antibodies.* J Clin Microbiol 1992; 30:40-44.
16. Rabalais GP, Stout GG, Ladd KL, Cost KM. *Rapid diagnosis of respiratory viral infections by using a shell vial assay and monoclonal antibody pool.* J Clin Microbiol 1992; 30:1505-08.

17. Johnston SLG, Siegel CS. *Evaluation of direct immunofluorescence, enzyme immunoassay centrifugation culture, and conventional culture for the detection of respiratory syncytial virus.* J Clin Microbiol 1990; 2394-97.
18. *Use of monoclonal antibodies for rapid diagnosis of respiratory viruses: Memorandum from a WHO meeting.* Boletim da Organização Mundial da Saúde. 1992; 70 (6):699-703.
19. Stout C, Murphy MD, Lawrence S, Julian S. *Evaluation of a monoclonal antibody pool for rapid diagnosis of respiratory viral infections.* J Clin Microbiol 1989; 448-52.
20. Chao RK, Fishaut M, Schwartzman JD, McIntosh K. *An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of respiratory syncytial virus in human nasal secretions.* J Infect Dis 1979; 2:483-86.
21. Salomon H, Grandien M, Avila MM, Peterson CA, Weissenacher MC. *Comparison of three techniques for detection of respiratory viruses in nasopharyngeal aspirates from children with lower acute respiratory infections.* J Med Virol 1989; 28:159-62.
22. Doller G, Schuy W, Tjhen KY, Stekeller B, Gerth HJ. *Direct detection of influenza virus antigen in nasopharyngeal specimens by direct enzyme immunoassay in comparison with quantitating virus shedding.* J Clin Microbiol 1992; 866-69.
23. Halstead D, Todd S, Frith G. *Evaluation of five methods for respiratory syncytial virus detection.* J Clin Microbiol 1990; 1021-25.
24. Hyypia T. *Detection of Adenovirus in nasopharyngeal specimens by radioactive and nonradioactive DNA probes.* J Clin Microbiol 1985; 21:730-33.
25. Gomes SA, Nascimento JP, Siqueira MM, Krawczuk MM, Pereira HG, Russel WC. *In situ hybridization with biotinylated DNA probes: a rapid diagnostic test for adenovirus upper respiratory infections.* J Virol Methods 1985; 12:105-10.
26. McIntosh K, Chanock RM. *Respiratory syncytial virus.* Virology. Editado pela B.N. Fields et col. Raven Press, Nova Iorque 1985.
27. Hendry RM, Talis AL, Godfrey E et al. *Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks.* J Infect Dis 1986; 153:291-97.
28. Mufson MA, Belshe RB, Orvell C. *Respiratory syncytial virus epidemics: Variable dominance of subgroups A and B strain among children.* 1981-1986. J Infect Dis 1988; 157:143-48.
29. Salomon H, Avila MM, Cerqueiro MC, Orvell C, Weissenbacher MC. *Clinical and epidemiologic aspects of respiratory syncytial virus antigenic variants in Argentinean children.* J Infect Dis 1991; 163:67.
30. Beem M. *Repeated infections with respiratory syncytial virus.* J Immunol 1967; 98:1115-22.
31. Paarot RH, Kim HW, Arrobio JO et al. *Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington DC. II infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex.* Am J Epidemiol 1973; 98:289-300.
32. Hall CB. *Virus sincicial respiratorio. Enfermedades infecciosas, principios y práctica.* II Mandell/Douglas/Bennett. 3a. edição, Editorial Médico Pan-Americano. 1991; 1334-349.
33. Ray CG, Minnich LL. *Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses.* J Clin Microbiol 1987; 355-57.

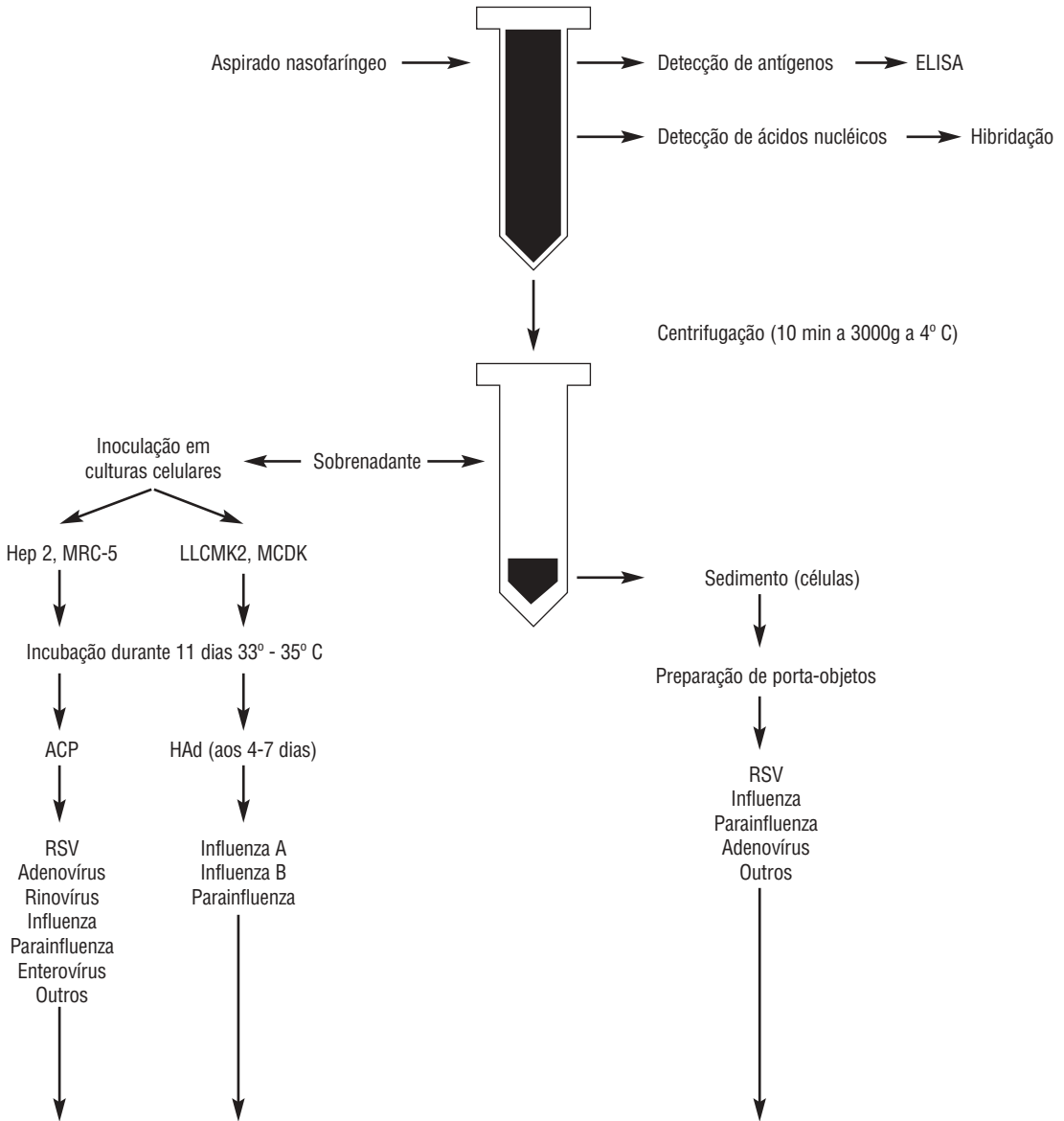
34. Hierholzer JC, Wigand R, Anderson LJ, Adrian T, Gold JW. *Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of 5 new serotypes of subgenus D (types 43-37)*. J Infect Dis 1988; 158:804-13.
35. Rowe, Huebner WPRJ, Gillmore LK. Parrot RH, Ward TG. *Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture*. Proc Soc Exp Biol Med 1953; 84:570.
36. Hierholzer JC. *Adenovirus*. Manual de Microbiologia Clínica, quinta edição. 1991; Capítulo 86. Balows A, Hausler WJ Jr., Hermann KL, Isenberg HD e Shadomy HJ.
37. Wadell G. *Adenoviridae: The adenoviruses*. p 284-300. Lennette EH, Halonen P, e Murphy FA. (ed). Laboratory diagnosis of infectious diseases: principles and practice, Vol II. Viral, rickettsial, and chlamydial diseases. Springer-Verlag, Nova Iorque.
38. Schmitz HR, Wigand R, Heinrich W. *World-wide epidemiology of human adenovirus infections*. Am J Epidemiol 1985;117:455-66.
39. Becroft DMO. *Pulmonary sequelae of epidemic type 21 adenovirus infection : 1-13 year follow-up*. Arch Dis Child 1979; 54:155-56.
40. Hierholzer JC. *Adenoviruses*. Diagnostic procedures for viral rickettsial and chlamydial infections, 6a edição . Em N.J. Schmidt e R.W Emmons (ed). American Public Health Association, Inc. Washington, DC. 1989; 219-64.
41. Chanock RM, McIntosh K. *Parainfluenza viruses*. Virologia. Segunda Edição, Editado por N. Fields, D.M. Knipe e col. Raven Press, Ltda, Nova Iorque 1990; 963-988.
42. Hendley JO. *Virus parainfluenza*. Mandell/Douglas/Bennett. Doenças Infecciosas, Princípios e Prática. 3a.Edição, Ed. Médica Pan-Americana. 1991; 1323-28.
43. Parrot RH, Vargosko AJ, Kim HW, Bell JÁ, Chanock RM. *Myxoviruses: parainfluenza*. Am J Public Health, 1962; 52:907-17.
44. Glezen WP, Frank AL, Taber LH, Kasel JÁ. *Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children*. J Infect Dis 1984; 150:851-57.
45. Minnich LL, Ray CG. *Early testing of cell cultures for detection of hemadsorbing viruses*. J Clin Microbiol 1987; 25:421-22.
46. Minnich LL, Ray CG. *Comparisons of direct immunofluorescence staining of clinical specimens for respiratory virus antigens with conventional isolation techniques*. J Clin Microbiol 1980; 12:391-194.
47. Kendal A, Harmon MW. *Orthomyxoviridae: The Influenza Viruses*. Diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas (Princípios e Práticas). Lennette EH, Halonen P. e Murphy FA. Editores. Vol II, Springer-Verlag, Nova Iorque, 1988; 602-625.
48. Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blodorn J. *Activation of influenza A virus by trypsin treatment*. Virology, 1975; 68:426-39.
49. Walls HH, Harmon MW, Slage JJ, Stocksdales C, Kendall AP. *Characterization and evaluation of monoclonal antibodies developed for typing influenza A and influenza B viruses*. J Clin Microbiol 1986; 23:240-45.

50. Walls HH, Johansson KH, Harmon MW, Halonen PE, Kendal AP. *Time-resolved fluoroimmunoassay with monoclonal antibodies for rapid diagnosis of influenza infections*. J Clin Microbiol 1986; 24:907-12.
51. Yamada A, Imanish J, Nakajima E, Nakajima N, Nakajima S. *Detection of influenza viruses in throat swab by using polymerase chain reaction*. Microbiol Immunol 1991; 35:259-65.
52. Claas ECJ, Sprenger MJW, Kleter GEM, Van Beek R, Quint WGV, Masurel N. *Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by polymerase chain reaction*. J Virol Methods 1992; 1-13.
53. Hamparian VV, Colonno RJ, Cooney MK, Dick EC et al. *A collaborative report: rhinoviruses extension of the numbering system from 89 to 100*. Virologia 1987; 159:191-92.
54. Dick EC, Jennings LC, Mink KA, Wartgow CD, Inhorn SL. *Aerosol transmission of rhinovirus colds*. J Infect Dis 1987; 156:442-48.
55. Landry ML. *Rhinoviruses*. Manual de Clínica Microbiológica. Quinta edição. 1991; Capítulo 84. Balows A, Hausler WJ Jr., Hermann KL, Isenberg HD e Shadomy HJ.
56. Fleming JO, El Zaatari FAK, Gilmore W, Berne JD, Burks JS, Stohman SA, Tourtellotte WW, Weiner LP. *Antigenic assesment of coronaviruses isolated from patients with sclerosis*. Arch Neurol 1988; 45:629-33.
57. Ray CG. *Coronaviruses*. Manual de Clínica Microbiológica. Quinta Edição. 1991; Capítulo 85. Ballows A, Hausler WJ Jr., Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ.
58. Modlin JF. *Coxsackieviruses, echovirus y nuevos enterovirus*. Mandell/Douglas/ Bennett. Doenças Infeciosas, Princípios e Práticas. 3a. Edição, Ed. Médica Pan-americana 1991; 1442-59.

**XI. ANEXOS**

<b>Quadro 1: Os vírus como causa de infecções respiratórias agudas</b>		
<b>Síndrome</b>	<b>Agente etiológico viral</b>	
	<b>Mais frequente</b>	<b>Menos frequente</b>
Infecção de vias respiratórias altas (resfriado comum)	Rinovírus Coronavírus Adenovírus Parainfluenza 3	Influenza A ou B Parainfluenza 1 ou 2 VSR Enterovírus
Faringite	Adenovírus Enterovírus	Influenza A VSR Parainfluenza 1 e 2 Rinovírus Coronavírus
Crupe	Parainfluenza 1, 2 e 3	Influenza A VSR Sarampo Coronavírus
Bronquiolite	VSR Parainfluenza 3	Adenovírus Parainfluenza 1 e 2 Influenza A ou B Rinovírus
Pneumonia	VSR Parainfluenza 3 Adenovírus Influenza A	Parainfluenza 1 e 2 Rinovírus

**Figura1: Diagnóstico etiológico direto de IRA virais**



Identificação de antígenos virais pela técnica de imunofluorescência (IF)