

## ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA O VÍRUS DO HERPES SIMPLES EM SÃO PAULO

Maria Conceição RODRIGUES (1) e Renato Piza de Souza CARVALHO (2)

### RESUMO

Usando a prova de neutralização do vírus do herpes simples em cultura de tecido, os Autores estudaram 99 soros humanos pertencentes a vários grupos etários. Encontraram 70,7% de soros positivos.

Os resultados obtidos coincidem com aqueles de outros Autores, sugerindo que, no grupo de indivíduos estudados, a infecção herpética primária ocorreu, com maior frequência, durante o segundo ano de vida.

### INTRODUÇÃO

Encontram-se na literatura citações de numerosos inquéritos sorológicos pesquisando anticorpos neutralizantes contra o vírus do herpes simples, em diversas partes do mundo. Apesar de se adotarem técnicas diferentes para as reações de neutralização, os resultados positivos apresentam concordância, mostrando incidência elevada nos soros de indivíduos adultos e baixa nos soros de crianças<sup>23, 2, 11, 6, 1, 17, 4, 19, 16, 13, 22</sup>.

A inexistência de trabalhos sobre este assunto em nosso meio nos levou à execução do presente estudo sorológico.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinados 99 soros de indivíduos com idade de 6 meses a 84 anos, colhidos em São Paulo, no período de 1957 a 1962 e mantidos congelados a  $-25^{\circ}\text{C}$ . Os soros dos grupos etários mais baixos foram colhidos de crianças hospitalizadas sem sinais clínicos de infecção herpética, e os demais, de

indivíduos aparentemente normais, em bancos de sangue, ou de pessoas hospitalizadas com doenças não infecciosas.

*Vírus* — Foi usada a linhagem Mc Intyre, recebida em 1961, de Merck Sharp Dohme Laboratories. O vírus foi mantido em células de linhagem contínua, sendo usada para preparo do antígeno a 13<sup>a</sup> passagem, com o título de  $10^{-4}$ .

*Cultura de células* — Foram usadas células de coração de macaco de linhagem contínua<sup>15</sup>, cultivadas em garrafas de 200 ml, com incubação estacionária a  $36^{\circ}\text{C}$ . Para crescimento foi utilizado meio de Hanks suplementado com 20,0% de soro de vitelo e 10,0% de hidrolisado de lactalbumina a 0,5%, e contendo 100 unidades de penicilina e 100  $\mu\text{g}$  de estreptomicina por ml. O meio de manutenção para preparo de antígeno e provas de neutralização foi semelhante ao de crescimento, apenas com substituição do soro de vitelo por soro de galinha a 5,0%.

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

(1) Biologista

(2) Docente-livre

*Preparo do antígeno* — O líquido nutriente das culturas de vírus foi colhido 24 horas após efeito citopático total e centrifugado a 2.500 r.p.m. por 10 minutos para deposição de detritos celulares. O sobrenadante foi retirado e conservado em congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o uso, contendo vírus com o título de  $10^{-4}$ .

*Soros humanos* — Todos os soros foram mantidos a  $-25^{\circ}\text{C}$ . Antes do uso foram descongelados, inativados a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos e diluídos em solução de Hanks a 1:8, 1:16, 1:32, 1:128, 1:512, 1:1024, 1:2048 e 1:4096.

*Técnica da reação de neutralização* — As misturas “vírus padrão (100 DCT 50%) + diluições do soro” foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente e semeadas na quantidade de 0,2 ml por tubo de células, sendo estas mantidas em estufa a  $36^{\circ}\text{C}$ . As reações de neutralização foram sempre acompanhadas dos seguintes controles: a) das células, b) do vírus padrão (neutralização por soro homotípico) e c) da dosagem do vírus padrão para controle da diluição usada na prova. As leituras das reações de neutralização foram feitas por um só observador, examinando-se os tubos di-

riamente e registrando-se os graus do efeito citopático. A leitura final foi realizada 24 horas após o efeito citopático dos tubos semeados com 100 DCT 50% do vírus padrão ter atingido 3 ou 4 cruzeiros. O título neutralizante do soro foi considerado como a maior diluição inicial que produziu neutralização, isto é, que apresentou pelo menos 2 cruzeiros a menos que os controles do vírus padrão. Os títulos 1:64 e 1:256 foram interpolados pela observação da intensidade do efeito citopático.

## RESULTADOS

Verificamos que 70 dos 99 soros (70,7%) examinados continham anticorpos neutralizantes para o vírus do herpes simples.

A análise do Quadro I mostra que a percentagem de soros positivos cresce de acordo com a idade. Entre 6 e 11 meses não encontramos soros positivos e entre 12-23 meses a positividade foi baixa (12,5%). Nos grupos etários de 2 e de 3-4 anos as percentagens dos soros positivos variaram de 64,3 a 75,0% e nos grupos etários mais elevados de 83,3 a 93,3%. Notamos assim que foi no 2.º ano de vida que houve maior frequência de infecção herpética primária.

QUADRO I

Distribuição etária dos anticorpos neutralizantes contra o vírus do herpes simples

Grupos etários	Nº de soros examinados	Soros positivos		Soros negativos	
		Nº	%	Nº	%
6-11 meses ...	6	0	0,0	6	100,0
12-23 meses ...	8	1	12,5	7	87,5
2 anos .....	8	6	75,0	2	25,0
3-4 anos .....	14	9	64,3	5	35,7
5-10 anos ....	12	10	83,3	2	16,7
11-20 anos ....	18	15	83,3	3	16,7
21-40 anos ....	15	14	93,3	1	6,7
> 40 anos ....	18	15	83,3	3	16,7
Total .....	99	70	70,7	29	29,3

Considerando-se os títulos de anticorpos neutralizantes, observamos que 29 soros (29,3%) possuíam títulos < 1:8; 24 (24,2%) apresentavam títulos variando entre 1:8 a 1:64, e, por fim, 46 (46,5%) tinham títulos entre 1:128 e 1:2048. O Quadro II mostra a distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes de acordo com a idade.

QUADRO II

Distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra o vírus do herpes simples, de acordo com a idade

TÍTULOS	IDADES							
	MESES		ANOS					
	6-11	12-23	2	3-4	5-10	11-20	21-40	> 40
2048						○○○		○○
1024					○○	○	○○	○
512			○	○	○○	○○		
256*				○○○	○○○	○○○	○○○	○○○
128		○		○	○○	○	○○○	○○○
64*			○			○	○	○
32			○	○○		○	○○○	○○
16			○○		○			○○
8			○	○		○		○
< 8	●●●●	●●●●	●●	●●●●	●●	●●●●	●	●●●●
TOTAIS	6	8	8	14	12	18	15	18

\* Títulos interpolados pelo leitor do efeito citopático

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nossos resultados são muito semelhantes aos encontrados pelos demais Autores que realizaram inquéritos idênticos em outros países, tanto naqueles que pesquisaram anticorpos neutralizantes como nos que dosaram anticorpos fixadores do complemento.

Com relação a este fato muitos trabalhos registram paralelismo dos resultados sorológicos obtidos com ambas as técnicas<sup>9, 8, 10, 7, 16, 22</sup>.

Há referências<sup>18, 21, 12</sup> sobre o encontro de diferenças antigênicas entre linhagens de vírus do herpes simples. Parece, no entanto, que essas diferenças são apenas quantitativas e não qualitativas. Diante desses dados,

usamos no presente trabalho, como já foi citado, apenas a linhagem Mc Intyre.

Alguns trabalhos<sup>5, 4, 22, 3</sup> referem a ocorrência da infecção herpética primária em maior proporção entre 1 e 3 anos. A análise do Quadro I, já citado, mostra que foi no 2.º ano de vida que encontramos maior frequência de infecção herpética primária.

SUMMARY

*A study on the age distribution of neutralizing antibodies against herpes simplex virus in São Paulo*

A serological study, using the neutralization test for the herpes simplex virus in tissue culture, was performed by the Authors in 99 human sera from several age groups. It was found that 70.7% of the sera were positive.

The results agree with those from other Authors and suggest that in the studied group the primary herpetic infection has occurred during the second year of life.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFZELIUS-ALM, L. — Aseptic (nonbacterial) encephalomenigitides in Gothenburg 1932-1950. Clinical and experimental investigation with special reference to the viruses of herpes, influenza, mumps and lymphocytic choriomeningitis. *Acta med. scandinav.* (suppl) 263:1, 1951.
2. ANDREWES, C. H. & CARMICHAEL, E. A. — A note on the presence of antibodies to herpes virus in post-encephalitic and other human sera. *Lancet* 1:857-858, 1930.
3. BAYLET, R. J.; ARMENGAUD, M.; SCHLUEP, R. & GUERIN, M. — Contribution à l'étude épidémiologique de l'herpès par la méthode sérologique. *Bull. Soc. Méd. Afr. Noire Lang. Franç* 8:433-434, 1963.
4. BUDDINGH, G. J.; SCHRUM, D. I.; LANIER, J. C. & GUIDRY, D. J. — Studies of the natural history of herpes simplex infections. *Pediatrics* 11:595-610, 1953.
5. BURNET, F. M. — *Virus as organism*. Cambridge, Harvard University Press, 1946.
6. BURNET, F. M. & LUSH, D. — Herpes simplex. Studies of the antibody content of human sera. *Lancet* 1:629-631, 1939.

7. DASCOMB, H. E.; ADAIR, C. V. & ROGERS, N. — Serological investigations of herpes simplex infections. *J. Lab. & Clin. Med.* 46:1-11, 1955.
8. GADJUSEK, D. C.; ROBBINS, M. L. & ROBBINS, F. C. — Diagnosis of herpes simplex infections by the complement-fixation test. *J.A.M.A.* 149:235-240, 1952.
9. HAYWARD, M. E. — Serological studies with herpes simplex virus. *Brit. J. Exper. Path.* 30:520-529, 1949.
10. HOLZEL, A.; FELDMAN, G. V.; TOBIN, J. O. & HARPER, J. — Herpes simplex; a study of complement-fixing antibodies at different ages. *Acta paediat.* 42:206-214, 1953.
11. HUDSON, N. P.; COOK, E. A. & ADAIR, F. L. — The relation of the herpes antiviral property of human blood to sex, pregnancy and menstruation. *J. Infect. Dis.* 59:60, 1936.
12. JAWETZ, E.; COLEMAN, V. R. & MERRILL, E. R. — Immunological differences among herpes simplex viruses. *Fed. Proc.* 13:498, 1954.
13. LAURINSICH, A.; MONACI, V.; GIOVANELLI, G. & VITALI, M. A. — Ricerche virologiche in soggetti sani ed in casi di malattia nei primi 3 anni di vita. *Riv. Ist. sieroterap. ital.* 37:366, 1962.
14. ROSS, C. A. C.; RUSSELL, W. C. & WILDY, P. — Herpes antigens from hamster kidney cell-cultures in the diagnosis of primary and recurrent infections. *Arch. f. Virusforschung* 15:58-66, 1964.
15. SALK, J. E. & WARD, E. M. — Some characteristics of a continuously propagating cell derived from monkey heart tissue. *Science* 126:1338-1339, 1957.
16. SCHMIDT, N. J. & LENNETTE, E. H. — A colorimetric neutralization test for herpes simplex with observations in neutralizing and complement fixing antibody levels in human sera. *J. Immunol.* 86:137-145, 1961.
17. SCOTT, T. F.; CORIELL, L.; BLANK, H. & BURGOON, C. F. — Some comments on herpetic infections in children with special emphasis on unusual clinical manifestations. *J. Pediatrics* 41:835-843, 1952.
18. SLAVIN, H. B. & GAVETT, E. — Antigenic dissimilarity between strains of herpes simplex virus. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 63:345-347, 1946.
19. TATENO, L.; YOKOYAMA, T.; SUZUKI, S.; SUGUIRA, A. & FRIKAYA, I. — Age distribution of the neutralizing antibody to herpes simplex virus. *Jap. J. Exper. Med.* 28:375-380, 1958.
20. WEYER, E. R. — Herpes antiviral substances: Distribution in various age groups and apparent absence in individuals susceptible to poliomyelitis. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 30:309-313, 1932.
21. WOMACK, C. R. & HUNT, B. P. — Serologic differences in strains of herpes simplex virus. *Science* 120:227-228, 1954.
22. YOSHINO, K.; TANIGUCHI, S.; FURUSE, R.; NOJIMA, T.; FUGII, R.; MINAMITANI, M.; TADA, R. & KUBOTA, H. — A serological survey for antibodies against herpes simplex virus with special reference to comparatively heat-labile complement fixing antibodies. *Jap. J. Med. Sc. Biol.* 15:235-247, 1962.
23. ZINSSER, H. & TANG, F. F. — Further experiments on the agent of herpes. *J. Immunol.* 17:343, 1929.

Recebido para publicação em 20/9/1965.