

ESTUDO DA PATOGENICIDADE PARA CAMUNDONGOS
RECÉM-NASCIDOS DE AMOSTRAS DE ECHOVIRUS TIPO 9
ISOLADAS DE CASOS DE MENINGITE DURANTE UM SURTO
EPIDÊMICO NO RIO DE JANEIRO

RITA MARIA RIBEIRO NOGUEIRA
JUSSARA PEREIRA DO NASCIMENTO
ALEXANDRE ALENCAR

A patogenicidade do echovirus tipo 9 para camundongos recém-nascidos foi estudada, utilizando-se 12 amostras isoladas em cultura de células primárias de rim de macaco, a partir do líquido de crianças com meningite. Os animais inoculados com o fluido da primeira passagem em células desenvolveram paralisia flácida, após um período de 5 dias, com a morte até o 8º dia. Os espécimens originais de líquido não continham suficiente vírus para provocar sinais clínicos nos animais inoculados no período de 21 dias de observação.

Ao exame histopatológico os animais doentes apresentaram miopatia necrotizante da musculatura paravertebral, língua e diafragma. Animais inoculados que não desenvolveram paralisia durante o período de observação apresentaram miosite discreta, sem que tenha sido encontrada necrose das fibras musculares.

O echovirus tipo 9 tem sido freqüentemente encontrado como agente etiológico de epidemias de meningite em diversas partes do mundo (Berglund et al, 1958; Galpine et al, 1958; Laforest et al, 1957; Nihoul, Quersin-Thirty & Weynants, 1957; Sabin, Krumbiegel & Wigand, 1958; Tyrrell & Snell, 1956).

Algumas amostras de echovirus tipo 9 são patogênicas para camundongos recém-nascidos, o que levou-os erroneamente a serem considerados como membros do grupo coxsackievirus (Coxsackie A 23) durante algum tempo (Archetti, Dubes & Wenner 1959 e Tyrrell & Snell, 1956). Estudos desta característica do vírus realizados por Eggers & Sabin (1959), demonstraram uma variação no comportamento de diferentes amostras.

Este trabalho tem como objetivo descrever a patogenicidade para camundongos recém-nascidos de amostras isoladas no Rio de Janeiro, durante um surto de meningite ocorrido entre setembro a dezembro de 1978.

As características clínicas e os aspectos de diagnóstico etiológico deste surto foram descritos anteriormente por Schatzmayr et al (1978), Torós et al (1980) e Nogueira (1981).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de echovirus tipo 9:

Foram utilizadas 12 amostras isoladas em células primárias de rim de macaco (RM), a partir do líquido (LCR) de crianças com meningite, assim como os respectivos LCR originais.

A concentração de vírus dos espécimens (líquor e fluidos de cultura de células RM) foi estimada, utilizando-se células RM e os resultados expressos em TCID₅₀/0,1ml, de acordo com Reed & Muench (1938).

Animais de experimentação:

Utilizamos camundongos brancos suíços *Mus musculus* variedade albina com menos de 24 horas de nascidos, da criação do biotério da FIOCRUZ. Os animais foram divididos em lotes com oito unidades e cada lote inoculado com os materiais acima descritos, pelas vias intraperitoneal e/ou intracerebral. Após a inoculação os animais foram observados diariamente por 21 dias. Animais, doentes ou não, foram sorteados e sacrificados em diferentes períodos de tempo para estudos histopatológicos.

Animais controles, não inoculados, foram incluídos em todos os experimentos.

RESULTADOS

Os animais inoculados com o fluido de cultura de tecido (primeira passagem do vírus em células RM) desenvolveram paralisia flácida após decorridos cinco dias de infecção (Fig. 1), com a morte dos animais ocorrendo até o 8º dia da infecção. Alguns dos animais inoculados apresentaram paralisia localizada unilateral nos membros anteriores, com recuperação total do membro comprometido após o 10º dia e sobrevivência animal. Lotes inoculados com o líquido original não mostraram qualquer sinal de doença até o 21º dia de observação.

A relação dose de vírus inoculado e número de animais doentes está apresentada na Tabela I. Em cinco amostras não foi possível realizar a titulação de vírus, porém estas comportaram-se exatamente como as expressas na tabela. A idade dos camundongos e a dose inoculada foram fatores críticos para o desenvolvimento da paralisia, enquanto que a via de inoculação utilizada não interferiu nos resultados observados. Quando utilizamos animais com mais de 24 horas de idade não foi possível reproduzir o quadro paralítico mesmo com os materiais contendo alta concentração de vírus.

Ao exame histopatológico, os animais doentes apresentaram uma severa miopatia necrotizante (Fig. 2) principalmente na musculatura paravertebral, língua e diafragma, sem comprometimento dos demais órgãos.

Animais inoculados que não desenvolveram paralisia durante o período de observação, apresentaram miosite discreta sem que tenha sido observado necrose das fibras musculares.

DISCUSSÃO

Apresentando um comportamento diferente dos enterovírus do grupo coxsackie, as amostras de echovirus tipo 9 só produzem paralisia nos camundongos quando inoculados até 24 horas após o nascimento. O fator tempo é tão importante quanto a dose de ví-



Fig. 1 – Animais paralíticos após inoculação do fluido da primeira passagem em células de rim de macaco de echovirus tipo 9.

TABELA I

Patogenicidade de amostras de echovirus tipo 9 para camundongos recém-nascidos comparando a inoculação do LCR original com a inoculação dos LCR após a primeira passagem em células de rim de macaco.

Nº amostra	LCR original		LCR após 1ª passagem	
	Dose inoculada TCID ₅₀ Log 10	Resultado	Dose inoculada TCID ₅₀ Log 10	Resultado
1	0,0	0/8*	7,0	7/8
2	nr	0/8	nr**	5/8
3	2,0	0/8	7,0	8/8
4	0,0	0/8	5,0	2/8
5	0,0	0/8	nr	8/8
6	0,0	0/8	7,0	8/8
7	0,0	0/8	nr	8/8

LCR = Líquido céfalo-raquiano

TCID₅₀ = Dose infectante 50% para cultura de tecido

* = Número de animais paralíticos/número de animais inoculados

** = não realizada

rus inoculada, pois é necessário que ocorram altas concentrações de vírus na musculatura do animal até o 4º dia de idade para o aparecimento da miosite necrosante incompatível com a sobrevivência do animal (Eggers & Sabin, 1959).

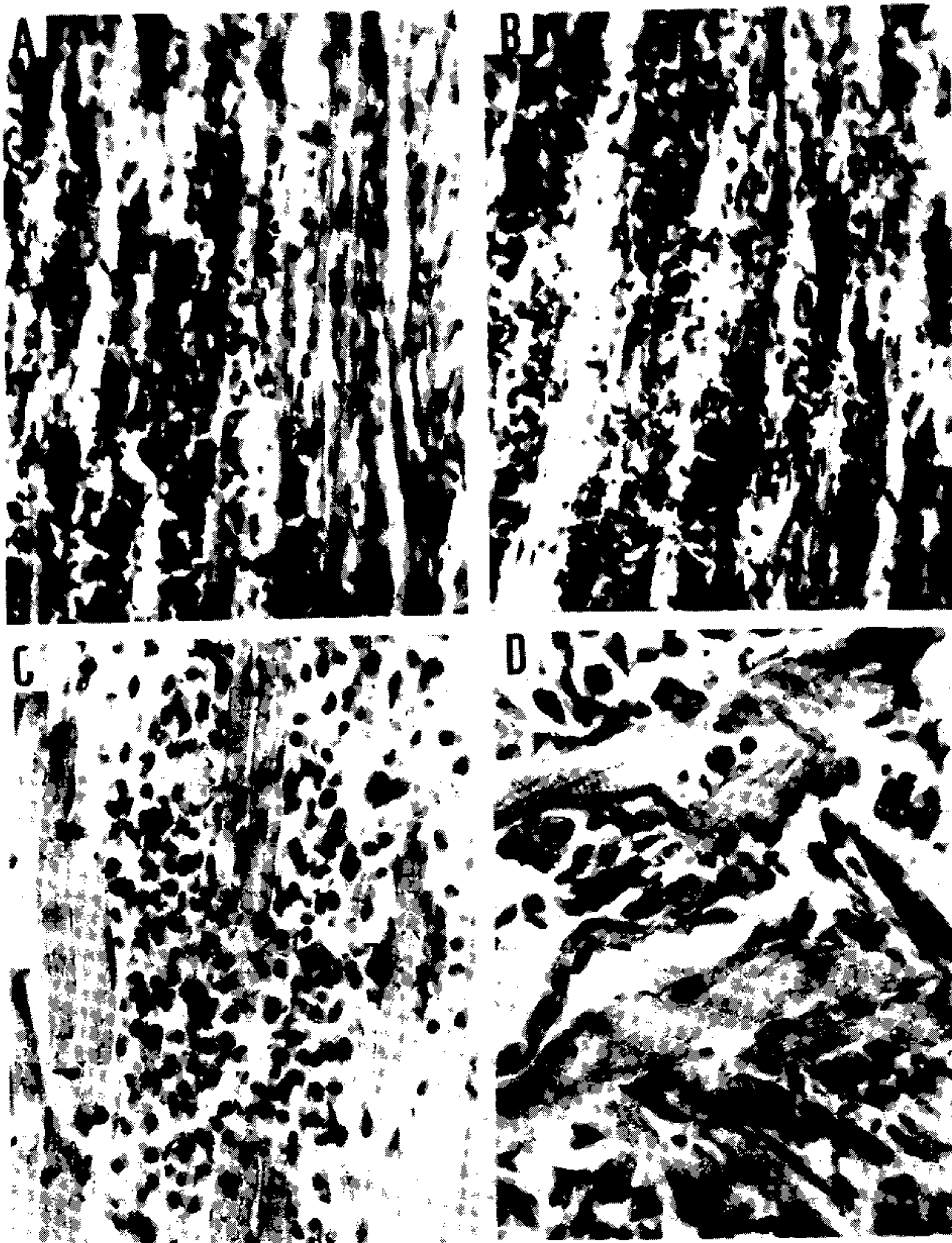


Fig. 2 – Lesões histopatológicas causadas por echovirus tipo 9 em camundongos recém-nascidos.

A e B – Dois campos microscópicos mostrando necrose de fibras musculares com intensa deposição de sais minerais nas mesmas, que aparece na fotomicrografia sob a forma de um granulado negro grosseiro. Início de infiltração inflamatória intersticial. Col. Hematoxilina-eosina. Oc. 10 x; Obj. 24 x Leitz.

C – Infiltração inflamatória intersticial constituída predominantemente por histiócitos e linfócitos. Col. Hematoxilina-eosina. Oc. 10 x; Obj. 43 x Leitz.

D – Pormenor, em grande aumento, da infiltração inflamatória, constituída predominantemente por células histiocitárias e linfócitos. Observam-se também volumosos mioblastos, responsáveis pela regeneração das fibras, que ocorre precocemente. Col. Hematoxilina-eosina. Oc. 10 x; Obj. 45 x Leitz.

Baixas concentrações de vírus (como ocorre no líquido) inoculadas em camundongos com até 1 dia de idade, ou inoculações de altas doses em animais com mais de 1 dia de idade, não permitem que sejam atingidas altas taxas de multiplicação viral na musculatura; em nosso caso o achado histopatológico principal foi miosite discreta sem necrose de fibras musculares, compatível com a ausência dos sinais de paralisia ou com a recuperação dos animais após a paralisia de um membro apenas. É importante ressaltar que as lesões extensas de miosite foram encontradas principalmente na musculatura paravertebral e não nos membros, sugerindo que a alteração dos membros superiores e/ou inferiores dos animais seja na realidade uma manifestação secundária à paralisia paravertebral.

Na histopatologia não foram encontrados corpúsculos de inclusões nucleares, nos animais recuperados, conforme foi anteriormente descrito por Johnson (1978) em estudo semelhante.

O comportamento das amostras de echovirus tipo 9 estudadas neste trabalho, em relação à patogenicidade para camundongos recém-nascidos foi semelhante às amostras epidêmicas descritas na literatura por Archetti, Dubes & Wenner (1959) e Mc Lean & Melnick (1957) entre outros, como capazes de causar paralisia flácida e miosite, porém diferente da amostra padrão Hill como discutido por Eggers & Sabin (1959).

SUMMARY

The pathogenicity for baby-mice of 12 strains of echovirus type 9, isolated in primary monkey kidney cells, from liquor specimens of children with meningitis, have been studied.

The animals inoculated with the first passage in tissue culture show after a period of 5 days, a flaccid paralysis and died by the 8th day after inoculation. The original liquor specimens did not contain enough virus to cause clinical signs in the inoculated animals, during the 21 days of observation.

Histopathological studies in the sick animals, show a necrosis of the paravertebral muscles, tongue and diaphragm. Inoculated animals which did not develop paralysis during the observation period, show light miositis without necrosis of the muscle tissue.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCHETTI, I.; DUBES, G.R. & WENNER, H.A., 1959. A comparative study of the prototypic Hill strain of echo virus type 9, and several coxsackie-like viruses related to it antigenically. *Arch. ges. Virusforsch.*, 9 :73-91.
- BERGLUND, A.; BOTTIGER, M.; JOHNSON, T. & WESTERMARK, S.E., 1958. An outbreak of aseptic meningitis with rubella-like rash probably caused by echovirus type 9. *Arch. ges. Virusforsch.*, 8 :294-305.
- EGGERS, H.J. & SABIN, A.B., 1959. Factors determining pathogenicity of variants of echo 9 virus for newborn mice. *J. Exp. Med.*, 110 :951-967.
- GALPINE, J.F.; CLAYTON, T.M.; ARDLEY, J. & BASTER, N., 1958. Outbreak of aseptic meningitis with exanthem. *Brit. Med. J.*, 1 :319-321.
- JOHNSON, M.A., 1978. Nuclear abnormalities in muscle regenerating after echo 9 virus infection in mice. *J. Neurol. Sci.*, 35 :117-133.

- LAFORREST, R.A.; MC NAUGHTON, G.A.; BEALE, A.J.; CLARKE, M.; DAVIS, N.; SULTANIAN, I. & RHODES, A.J., 1957. Outbreak of aseptic meningitis (meningoencephalitis) with rubelliform rash. Toronto, 1956. *Can. Med. Assoc. J.*, 77 :1-4.
- MC LEAN, D.M. & MELNICK, J.L., 1957. Association of mouse pathogenic strain of echo virus type 9 with aseptic meningitis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 94 :656-660.
- NIHOUL, E.; QUERSIN-THIRY, L. & WEYNANTS, A., 1957. Echo virus type 9 as the agent responsible for an important outbreak of aseptic meningitis in Belgium. *Am. J. Hyg.*, 66 :102-118.
- NOGUEIRA, R.M.R., 1981. Surto de Meningite pelo echovirus tipo 9 no Rio de Janeiro, 1978. Tese de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, 72 p.
- REED, L.J. & MUENCH, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27 :493-497.
- SABIN, A.B.; KRUMBIEGEL, E.R. & WIGAND, R., 1958. Echo type 9 virus disease. *Am. J. Dis. child.*, 96 :196-219.
- SCHATZMAYR, H.G.; ZEPEDA-BERMUDEZ, J.A.; NOGUEIRA, R.M.R.; AZEREDO, R.S. & NASCIMENTO, J.P., 1978. Isolation of echo 9 virus from cases of aseptic meningitis. *Rev. Microbiol.*, 9 :210-211.
- TORÓS, M.; CLAPAUCH, F.; NOGUEIRA, R.M.R.; SCHATZMAYR, H.G.; ZEPEDA-BERMUDEZ, J.A.; AZEREDO, R.S. & NASCIMENTO, J.P., 1980. Surto de meningite por echo 9 na zona sul do Rio de Janeiro. *J. Pediatria*, 48 :155-158.
- TYRRELL, D.A.J. & SNELL, B., 1956. Recovery of a virus from cases of an epidemic exanthem associated with meningitis. *Lancet* 2 :1028-1029.