

## INFLUENZA TIPO A EM GALINHAS: INQUÉRITO SOROLÓGICO ATRAVÉS DA INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO E DA IMUNODIFUSÃO

Magda Mary Castelo ANRAKU (1), Aramis Augusto PINTO (2), Cid Vieira Franco de Godoy (2) e  
Osmane HIPÓLITO (3)

### RESUMO

Cento e dez soros de galinhas colhidos ao acaso foram testados pela inibição da hemaglutinação (IH) e pela imunodifusão (ID) para a pesquisa de anticorpos tipo-específicos para o vírus A da influenza. Antes de ser processada a reação de inibição da hemaglutinação os soros foram aquecidos a 56°C por 30 minutos e tratados pelo R.D.E. para a eliminação dos inibidores inespecíficos. Dos 110 soros, 24 (21,8%) foram positivos. Catorze soros (12,7%) foram positivos à IH e 22 (20,0%) à ID. Doze soros foram positivos a ambas as reações, nove apenas à ID e dois apenas à IH. Os resultados sugerem a possibilidade da galinha ser reservatório natural do vírus A da influenza.

### INTRODUÇÃO

Os Autores estrangeiros têm realizado intensas investigações em animais com o objetivo de conhecer melhor os possíveis reservatórios naturais do vírus tipo A da influenza. Entre as aves, os patos, perus, faisões e codornas já são apontados como conhecidos reservatórios de vírus.

Em nosso meio ANRAKU & col.<sup>1</sup> demonstraram que as aves silvestres podem ser reservatórios dos referido vírus. Nada foi feito, entretanto, com relação às aves domésticas.

O método da imunodifusão já foi empregado por PEREIRA & col.<sup>4</sup> na influenza eqüina, por ANRAKU & col.<sup>1</sup> no soro-diagnóstico da influenza em aves silvestres e por SCHILD & col.<sup>5</sup> na influenza humana.

O presente trabalho foi idealizado com o objetivo de verificar a possível existência de anticorpos tipo-específicos para o vírus tipo A da influenza em soros de galinhas, usando como técnicas sorológicas a inibição da hemaglutinação (IH) e imunodifusão (ID).

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### Antígeno

Foi utilizado como antígeno o líquido alantóico colhido de ovos embrionados inoculados três dias antes com o vírus amostra padrão N (tipo A da influenza). O referido líquido foi centrifugado a baixa temperatura, distribuído em frascos e estocado.

#### Soros

*Soro hiper-imune* — Foi preparado em galinha pela inoculação do vírus com título igual ou maior que 1:320, segundo a técnica abaixo: 1ª semana: inoculação de 10 ml de líquido alantóico purificado por via intraperitoneal e de 1 ml por via endovenosa; 2ª semana: inoculação de 10 ml por via intraperitoneal. 3ª semana: idem, idem. 4ª semana; sangria na veia da asa. O soro colhido após a retração do coágulo era titulado pela prova de inibição da hemaglutinação. Quando o título era satisfatório, procedia-se então à

Trabalho realizado no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

- (1) Professor Assistente Doutor, Instituto de Ciências Biomédicas, U.S.P., São Paulo, Brasil
- (2) Professor Adjunto, Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.
- (3) Professor Titular, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnia, U.S.P.

sangria definitiva por punção cardíaca. Com essa técnica obtinham-se soros hiperimunes com título ao redor de 1/200 pela reação de inibição da hemaglutinação.

*Soros de galinhas* — Os soros, em número de 110, foram colhidos ao acaso, de galinhas de diversas procedências.

Com o objetivo de verificar o melhor método para a eliminação dos inibidores inespecíficos da reação de IH, dez soros com títulos  $\geq 1:1024$  foram submetidos a três tratamentos diferentes: a) aquecimento a 56°C por 30 minutos; b) tratamento pelo R.D.E.; c) com combinação de a e b.

Os resultados, apontados na Tabela I, mostram que o último tratamento foi melhor, motivo porque foi obtido como padrão.

#### Reações sorológicas

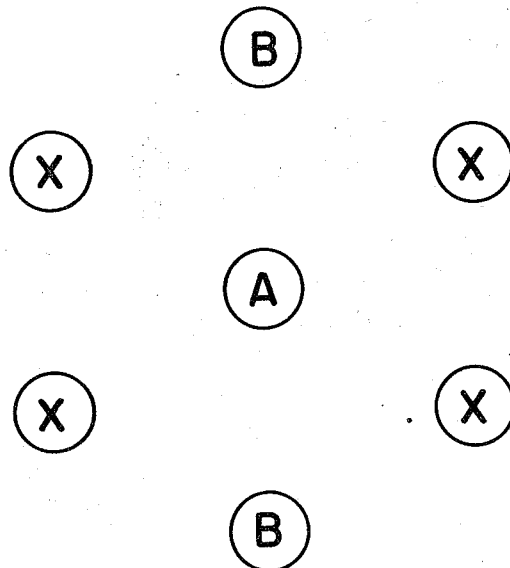
##### Reação de inibição da hemaglutinação

Essa reação foi realizada de acordo com a técnica descrita por TAKATSU<sup>6</sup>, respeitando-se as condições de tempo e temperatura para o vírus da influenza.

##### Reação de imunodifusão

Para essa reação foram preparadas lâminas com soluções de Ionagar a 0,2 e 1%. Em seguida, com molde próprio foram preparadas sete cavidades das quais o excesso de ágar foi retirado com o auxílio de uma bom-

ba de vácuo. Os elementos eram dispostos de acordo com o esquema:



A = antígeno SDS  
B = soros padrões  
X = soros em teste

Após a colocação de todos os elementos adicionava-se uma gota de SDS (Dodecyl sulfato de sódio), detergente que possibilita a dispersão e desintegração da partícula viral.

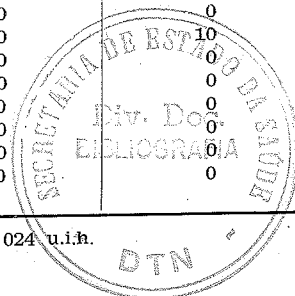
A leitura era feita 12 e 24 horas após, e a coloração era realizada com tiazina vermelha a 1%.

T A B E L A I

Resultados em unidades IH de dez soros (\*) submetidos a três tratamentos para eliminação dos inibidores inespecíficos à reação IH

N.º do soro	Antes do tratamento	Depois do tratamento		
		Trat. a) 56°C por 30'	Trat. b) RDE	Trat. c) 56°C/30' + RDE
5	1.024	8	10	0
9	1.024	4	10	0
23	1.024	64	10	0
35	1.024	16	10	10
36	1.024	8	10	0
38	1.024	8	10	0
40	1.024	2	40	0
43	1.024	2	0	0
69	1.024	0	0	0
70	1.024	0	0	0

(\*) Antes do tratamento os soros possuíam título igual ou superior a 1.024 u.i.h.



## RESULTADOS

Os resultados acham-se condensados nas Tabelas I, II e III.

TABELA II

Resultados apresentados em 24 soros de galinha examinados pelas reações de IH e ID para a pesquisa de anticorpos contra o vírus tipo A da influenza

N.º do soro	Reação ID	Reação IH
2	+ (fraca)	1:10
9	+ (fraca)	—
14	+ (fraca)	—
20	+ (fraca)	—
21	+	—
22	+ (fraca)	—
23	+ (fraca)	—
24	+ (fraca)	—
29	+ (fraca)	—
30	—	1:10
34	+	1:10
39	+ (?)	—
41	+	1:20
42	+	1:10
44	+	1:40
45	+	1:160
46	+	1:80
67	+	—
80	+	1:10
85	+	1:10
88	+	1:10
89	+	1:10
93	—	1:10
96	+	1:10
Total	2%	22 (91,6%) 14 (58,1%)

TABELA III

Resultados obtidos no exame de 110 soros de galinhas pelas reações de I. H. e I. D. na pesquisa de anticorpos tipo específico e vírus A de influenza

Total de soros examinados	110
Soros negativos	86
Soros positivos a uma ou duas reações sorológicas	24
Soros positivos às reações de IH e ID	12
Soros positivos somente para ID	9
Soros positivos somente para IH	2

Na Tabela I encontram-se os resultados dos tratamentos a que foram submetidos 10 soros com títulos iguais ou superiores a 1.024 u.i.h. Dos três métodos o que ofereceu melhores resultados foi o último que consistia em inativar os soros pelo aquecimento a 56°C por 30 minutos e submetê-los posteriormente ao tratamento pelo R.D.E.

Na Tabela II podem ser examinados os resultados apresentados pelos 24 soros positivos às reações de ID e IH. Na reação de ID alguns dos soros apresentaram apenas uma linha fraca de precipitação. Na reação de IH os títulos variaram de 1:10 a 1:160.

A Tabela III resume os resultados encontrados e apontados a coincidência entre as duas reações observada em alguns soros.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram que o tratamento dos soros pelo aquecimento a 56°C e, em seguida, pelo R.D.E., revelou ser o melhor método para a eliminação dos inibidores inespecíficos da hemaglutinação e foi usado como padrão em todos os 110 soros testados (Tabela I).

Submetidos às reações de IH, 24 dos 110 soros testados apresentaram reação positiva a uma ou ambas as provas, o que dá uma prevalência de 21,8% (Tabelas II e III).

A concordância entre as duas provas sorológicas foi relativamente baixa, pois dos 24 soros positivos apenas 12 (50,0%) foram positivos a ambas as reações. É verdade que oito soros positivos à ID e negativos à IH deram apenas reação fracamente positiva. Excluídos esses soros a concordância seria considerada excelente, com apenas dois resultados discordantes.

A linha de precipitação à ID foi única, correspondente à ribonucleoproteína e surge com os títulos  $\geq$  1:40 u.i.h. Os resultados obtidos indicam que o método da imunodifusão (ID) pode ser usado em inquéritos epidemiológicos e para o diagnóstico precoce da doença em galinhas, da mesma forma que foi demonstrado por PEREIRA & col.<sup>4</sup> na influenza eqüina e por SCHILD & col.<sup>5</sup> na influenza humana. Estes últimos Autores sugerem ainda a possibilidade de uma sorologia quanti-

tativa através da imunodifusão pela análise do tipo da linha de precipitação que surge na reação.

De acordo com os resultados obtidos as galinhas podem ser consideradas como reservatórios potenciais do vírus tipo A da influenza.

#### S U M M A R Y

*Type A influenza in fowl: Serological survey by hemagglutination-inhibition and immunodiffusion tests.*

One hundred and ten chicken sera randomly collected were tested by hemagglutination-inhibition (HI) and immunodiffusion tests for specific antibodies against avian Influenza type A virus. Prior to HI tests, were treated for 30 minutes at 56°C followed by RDE the treatment the sera remove unespecific inhibitors.

Of the 110 sera, 24 (21.8%) were positive for type A Influenza virus. Fourteen (12.7%) were positive by HI and 22 (20%) by ID. Twelve sera were positive in both tests, nine only by ID and two only by HI.

The possible role of chickens as natural reservoirs of A influenza virus is suggested by these results.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANRAKU, M. M. C.; FARIA, W. C. & TAKAYAMA, D. C. — Influenza aviária em aves silvestres brasileiras. I. Inquérito sorológico através de imunodifusão. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13:292-296, 1971.
2. CROWLE, A. J. — A simplified micro double-diffusion agar precipitin technique. *J. Lab. Clin. Med.* 52:784-787, 1956.
3. HANA, L. & HOYLE, L. — The desintegration of the internal nucleoprotein of influenza virus A with the production of serologically distinct components. *Acta Virol.* 10:506-512, 1966.
4. PEREIRA, H. G.; TAKIMOTO, S. & RIBEIRO DO VALLE, L. A. — Comparação do complemento e de imunodifusão no diagnóstico da influenza. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:211-216, 1970.
5. SCHILD, G. C.; WINTER, W. D. & BRAND, C. M. — Serological diagnosis of human influenza infections by immunoprecipitin — techniques. *Bull. WLD. Hlth. Org.* 45:465-471, 1971.
6. TAKATSY, G. — The use of spiral loops in serological and virological micromethods. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 3:191, 1955.

Recebido para publicação em 27/12/1974.