

A REAÇÃO DE IMUNO-ADERÊNCIA EM ARBORVÍRUS DO GRUPO A ISOLADOS NO BRASIL

I. Comparação com as reações de fixação do complemento e inibição da hemaglutinação

Maria Brazil ESTEVES⁽¹⁾, Octavio Augusto PEREIRA⁽²⁾, Moacyr Rossi NILSSON⁽³⁾
e Ewald Ernesto TRAPP⁽⁴⁾

RESUMO

Os autores utilizaram os 6 arborvírus do grupo A isolados no Brasil (Mayaro, Aurá, Una e as Encefalites tipo Leste, Oeste e venezuelana) e seus respectivos soros hiperimunes.

Os resultados obtidos indicam que a reação de imuno-aderência apresenta maior sensibilidade (reações positivas em maiores diluições dos soros e antígenos) e maior especificidade (menor número de reações cruzadas), do que as reações de inibição da hemaglutinação e fixação do complemento.

INTRODUÇÃO

O estudo sorológico dos arborvírus, baseado nas reações de inibição da hemaglutinação, fixação do complemento e reação de neutralização, apresenta alguns problemas quais sejam: a complexidade de execução e o número relativamente grande de cruzamentos nas duas primeiras, e as grandes exigências de animais, ou de uma secção montada de cultura de tecidos para a última.

Os bons resultados obtidos por ESTEVES³ em outro sistema de vírus, utilizando a reação de imuno-aderência, técnica desenvolvida por NELSON^{6,7}, nos encorajou a tentar o mesmo processo nos arborvírus do grupo A.

A finalidade da presente publicação é a comparação desta reação com as de fixação do complemento e inibição da hemaglutina-

ção, sob os pontos de vista de sensibilidade e especificidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Os soros e antígenos usados nas três reações foram preparados a partir das seguintes "amostras-tipo" do "Belem Virus Laboratory", isoladas por CAUSEY¹: AR 20290, AR 10315, AR 13136, AN 7526, AN 10967, respectivamente Mayaro, Aurá, Una e Encefalites tipo Leste (EEE) e Venezuelana (VEE). O vírus da Encefalite tipo Oeste (WEE) foi isolado no Rio de Janeiro por BRUNO-LOBO & col.⁴.

Soros:

Todos os soros utilizados foram preparados em camundongos adultos, mediante 5 ino-

Trabalho subvencionado pelo Fundo de Pesquisas do Instituto Biológico e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

- (1) Médico, Assistente da Secção de Imunologia do Instituto Biológico, São Paulo.
- (2) Assistente da Cadeira de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.
- (3) Veterinário, Assistente da Secção de Enzootias do Instituto Biológico, São Paulo.
- (4) Veterinário, Chefe da Secção de Enzootias do Instituto Biológico, São Paulo.

culações de 0,1 ml, por via intraperitoneal, de uma suspensão a 10% de cérebros de camundongos recém-nascidos infectados.

Para as duas primeiras inoculações a suspensão foi formolada a 0,4%, sendo as 3 últimas feitas com vírus vivo. O intervalo entre as inoculações foi de 3-4 dias, e a sangria feita 7 dias após a última injeção. Os soros obtidos foram inativados e conservados em ampolas, a -30°C até o momento de serem usados.

Antígenos:

Os antígenos para a reação de inibição da hemaglutinação foram preparados pela técnica de sacarose-acetona, descrita por CLARKE & CASALS². Para as reações de fixação do complemento e imuno-aderência, usamos antígenos preparados a partir de cérebros de camundongos recém-nascidos infectados, triturados e suspensos a 1:5 em tampão de barbiturato. Essas suspensões foram distribuídas em pequenas porções e conservadas a -30°C . No momento de usar foram descongeladas, e centrifugadas a 1.500 r.p.m./15 minutos a 5°C . Os antígenos foram usados em fixação do complemento a partir da diluição 1:10, não apresentando em nenhum dos ensaios qualquer poder anticomplementar.

Técnica da reação de inibição da hemaglutinação:

As reações de inibição da hemaglutinação obedeceram à técnica de CLARKE & CASALS², com hemácias de ganso, tendo sido executadas em placas especiais descritas por MONTEIRO & PEREIRA⁵.

Não foram incluídos nesta prova os antígenos Mayaro e Una. Os soros foram usados em diluições duplas a partir de 1:20.

Técnica das reações de fixação de complemento e imuno-aderência:

As técnicas empregadas nas reações de fixação do complemento e imuno-aderência estão descritas em publicação anterior de um de nós³.

As leituras de imuno-aderência foram feitas sempre 30 minutos após a última incubação a 37°C , e considerados positivos os resultados 4 e 3.

RESULTADOS

Os resultados constam dos quadros I, II, V, VI e da fig. 1.

QUADRO I

Titulos máximos dos soros frente aos antígenos homólogos

Soros	Inibição da hemaglutinação *	Fixação do complemento	Imuno-aderência
EEE	1:640	1:200	1:3200
WEE	1:160	1:100	1:400
VEE	1:20	1:100	1:800
Mayaro	—	1:200	1:1600
Aurá	1:640	1:200	1:1600
Una	—	1:50	1:800

* Titulos obtidos frente a 4 unidades hemaglutinantes.

QUADRO II

Titulos máximos dos antígenos frente aos soros homólogos

Antígenos	Fixação do complemento	Imuno-aderência
EEE	1:25	1:400
WEE	1:100	1:3200
VEE	1:100	1:3200
Mayaro	1:25	1:1600
Aurá	1:200	1:3200
Una	1:10	1:100

ESTEVEES, M. B.; PEREIRA, O. A.; NILSSON, M. R. et al. — A reação de imuno-aderência em arborvírus do grupo A isolados no Brasil. I. Comparação com as reações de fixação do complemento e inibição da hemaglutinação. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 4:351-357, 1962.

QUADRO III

Comparação da especificidade das reações de imuno-aderência e fixação do complemento em altas diluições do antígeno

Imuno-aderência					Fixação do complemento *			
Diluições dos soros	Antígeno Mayaro				Diluições dos soros	Antígeno Mayaro		
	1:200	1:400	1:800	1:1600		1:10	1:25	1:50
Mayaro					Mayaro			
1:400	4	4	4	3	1:25	0	30	80
1:800	4	3	2	0	1:50	0	30	100
1:1600	2	0	0	0	1:100	0	80	100
Una					Una			
1:200	4	4	2	2	1:25	10	40	80
1:400	4	0	0	0	1:50	10	60	100
					1:100	10	80	100

* As cifras relativas à fixação de complemento exprimem percentagem de lise.

QUADRO IV

Comparação dos títulos dos soros Aurá e VEE frente ao antígeno VEE

Soros	Reações		
	Inibição da hemaglutinação	Fixação do complemento	Imuno-aderência
Aurá	1:160	1:400	1:800
VEE	1:20	1:100	1:800

QUADRO V

Reações de inibição da hemaglutinação com arborvírus do Grupo A e seus respectivos soros hiperimunes

Soros	Antígenos			
	EEE	WEE	VEE	Aurá
EEE	1:640*	—**	1:20	—
WEE	—	1:160	—	1:20
VEE	—	—	1:20	—
Aurá	1:20	1:40	1:160	1:640
Mayaro	—	1:20	—	—
Una	—	—	—	—

* Os títulos foram obtidos frente a 4 unidades hemaglutinantes.

** As reações — correspondem a títulos inferiores a 1:20.

QUADRO VI

Reações de fixação do complemento com arborvírus do Grupo A e seus respectivos soros hiperimunes

Soros	Antígenos												Contrôle do soro						
	V.E.E.			Aurá			Mayaro			E.E.E.				W.E.E.			Una		
	1:25	1:50	1:100	1:25	1:50	1:100	1:10	1:25	1:50	1:10	1:25	1:50		1:25	1:50	1:100	1:10	1:25	1:50
W.E.E.	1:25	100	100	80	100	100	80	100	100	100	100	100	100	0	0	10	100	100	100
	1:50	100	100	100	100	100	80	100	100	100	100	100	100	0	0	20	80	80	80
	1:100	100	100	100	100	100	80	100	100	100	100	100	100	20	20	40	100	100	100
	1:200	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	100	100	100	100	100
V.E.E.	1:10	30	40	50	70	70	50	80	80	80	80	80	80	80	80	100	80	80	100
	1:25	10	30	70	70	70	80	80	80	80	80	80	80	80	80	100	80	80	100
	1:50	10	30	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	100	80	80	100
	1:100	40	80	80	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	1:200	80	80	80	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
E.E.E.	1:25	20	80	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	40	80	100	100	100	100
	1:50	50	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	80	100	80	80	100
	1:100	60	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	80	100	80	80	100
	1:200	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	80	100	80	80	100
Aurá	1:50	0	10	70	0	0	0	0	10	100	100	100	100	0	0	10	100	100	100
	1:100	0	30	100	0	0	0	0	30	100	100	100	100	0	0	30	100	100	100
	1:200	10	100	100	50	40	50	40	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	1:400	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Mayaro	1:25	80	80	80	80	100	0	30	80	100	100	100	100	0	30	80	100	100	100
	1:50	60	80	100	100	100	0	30	100	100	100	100	100	0	30	100	100	100	100
	1:100	100	100	100	100	100	0	80	100	100	100	100	100	0	80	100	100	100	100
	1:200	100	100	100	100	100	0	80	100	100	100	100	100	0	80	100	100	100	100
Una	1:25	80	80	100	80	80	10	40	80	100	100	100	100	10	40	80	100	100	100
	1:50	100	100	100	80	80	10	60	80	100	100	100	100	20	80	100	100	100	100
	1:100	100	100	100	80	80	10	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	1:200	100	100	100	100	100	50	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Contrôle do antígeno		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Os dados obtidos referem-se à percentagem de lise.

ESTEVES, M. B.; PEREIRA, O. A.; NILSSON, M. R. et al. — A reação de imuno-aderência em arborvírus do grupo A isolados no Brasil. I. Comparação com as reações de fixação do complemento e inibição da hemaglutinação. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 4:351-357, 1962.

QUADRO VII
Reações de imuno-aderência com arborvírus do Grupo A e seus respectivos soros hiperimunes

Soros	Antígenos										Controle do soro		
	V E E		Aurá		Mayaro		E E E		W E E			Una	
	1:400 1:800 1:1600 1:3200	1:800 1:1600 1:3200 1:6400	1:800 1:1600 1:3200 1:6400	1:200 1:400 1:800 1:1600	1:50 1:100 1:200 1:400	1:400 1:800 1:1600 1:3200	1:25 1:50 1:100 1:200						
W E E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
V E E	4 4 4 4 4 4 4 4 4 3 0 0 2 0 0 0	4 4 4 4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 2 2 2 2 0 0 0 0 0 0 0 0	2 2 2 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0
E E E	4 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0	0	0	4 4 3 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0	2 2 2 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0	0	0	0	0	0
Aurá	4 4 0 0 4 3 0 0 2 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 2 4 4 2 0 3 2 0 0 0 0 0 0	4 4 4 2 4 4 2 0 3 2 0 0 0 0 0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mayaro	4 4 4 4 3 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 3 4 3 2 0 2 0 0 0 0 0 0 0	3 1 1 1 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0	0	0	0	0	0
Una	4 4 4 4 2 2 2 2 0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 3 3 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 3 3 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 4 4 3 3 4 4 2 2 4 0 0 0	4 4 4 4 4 4 3 3 2 2 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 4 4 3 3 2 2 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 4 4 3 3 2 2 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 4 4 3 3 2 2 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 4 4 3 3 2 2 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 4 4 3 3 2 2 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 4 4 3 3 2 2 0 0 0 0 0 0	4 4 4 4 4 4 3 3 2 2 0 0 0 0 0 0	0
Controle do antígeno	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Pelos resultados expressos nos quadros I e II pode-se observar nitidamente a superioridade de sensibilidade da reação de imuno-aderência sobre as demais. Os títulos obtidos para cada soro contra seu antígeno homólogo naquela prova, são consideravelmente mais elevados do que os obtidos nas provas de fixação do complemento e inibição da hemaglutinação. Observa-se também o mesmo em relação às diluições dos antígenos.

ao antígeno VEE, foram idênticos, o que fala fortemente a favor da maior especificidade desta prova em relação às anteriores. Porém, maiores diluições do antígeno VEE tornam negativa a reação com o soro Aurá, mantendo-se a mesma ainda positiva para o soro homólogo.

Finalmente: (a) a facilidade de execução da prova e (b) a simplicidade do preparo dos antígenos e dos soros para a reação, em contraposição com (c) a complexidade dos

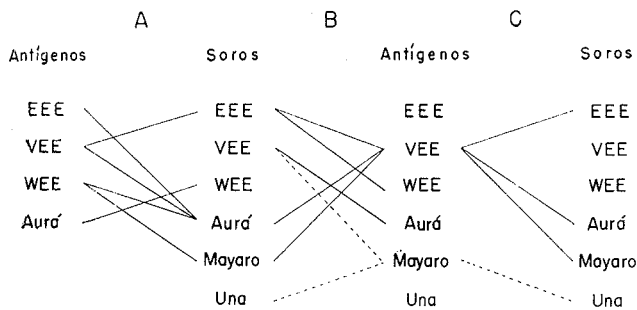


Fig. 1 — Reações heterólogas observadas com arborvírus do grupo A em provas de: A — inibição da hemaglutinação; B — fixação do complemento; C — imuno-aderência. As linhas pontilhadas referem-se a antígenos não utilizados na inibição da hemaglutinação.

A fig. 1 mostra claramente a maior especificidade da reação de imuno-aderência. As seis linhas de cruzamento reveladas através da reação de inibição da hemaglutinação se reduzem a cinco na reação de fixação do complemento e a apenas três na reação de imuno-aderência, excluindo-se aqueles obtidos com o antígeno Mayaro, não utilizado na primeira reação. Se, no entanto, caminhar-mos para maiores diluições do antígeno, haverá desaparecimento dos cruzamentos na reação de imuno-aderência, o que não ocorre na fixação do complemento, como se pode observar no quadro III. Observa-se no quadro IV que nas reações de fixação do complemento e inibição da hemaglutinação, o antígeno VEE revelou títulos maiores para o soro Aurá do que para seu soro homólogo. Tal fato pode ser explicado pela maior potência do primeiro soro em relação ao segundo, como é evidenciado de forma clara nas reações homólogas (Quadro I).

Entretanto, na prova de imuno-aderência os títulos dos dois soros em causa, frente

antígenos extraídos por sacarose e acetona e (d) pelos tratamentos prévios dos soros por caolim e hemácias de ganso, exigidos pela reação de inibição da hemaglutinação, fazem da imuno-aderência uma reação de execução mais simples, de obtenção de resultados mais rápidos e precisos, e ao alcance de laboratórios menos aparelhados.

SUMMARY

The reaction of immune-adherence in arbovirus of the group A isolated in Brazil. I — Comparison with the complement fixation and hemagglutination-inhibition tests.

The authors carried out comparative serologic studies on immune-adherence, hemagglutination-inhibition and complement fixation tests of group A arboviruses.

Six different arboviruses of group A, which have already been isolated in Brazil

(Mayaro, Aurá, Una, as well as Eastern, Western and Venezuelan Encephalitis) and their hyperimmune sera were used for this purpose.

The results show that the reaction of immune-adherence is more accurate (lower concentration for sera and antigens) and more specific (smaller number of cross reactions) than the other reactions used in the experiments.

REFERÊNCIAS

1. CAUSEY, O. R. — Belém Virus Laboratory. Annual Report, 1961.
2. CLARKE, D. H. & CASALS, J. — Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne virus. Am. J. trop. Med. & Hyg. 7:561-573, 1958.
3. ESTEVES, M. B. — Aplicação da reação de imuno-aderência à tipificação do vírus aftoso. Arq. Inst. biol. 26:167-175, 1959.
4. LOBO, G. B.; LOBO, M. B.; TRAVASSOS, J.; PINHEIRO filho, F. & PAZIN, I. P. — Estudos sobre os arborvírus. III. Isolamento de um vírus sorologicamente relacionado ao subgrupo Western-Sindbis de um caso de encefalomielite equina, ocorrido no Rio de Janeiro. An. Microbiol. 9:183-195, 1961.
5. MONTEIRO, E. L. & PEREIRA, O. A. C. — "Batoques" de polietileno no preparo de placas para hemaglutinação e fixação do complemento. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3:209-212, 1961.
6. NELSON, R. A. — The immune-adherence phenomenon. Science, London 118:733-737, 1953.
7. NELSON, R. A. — Le test d'immobilisation des tréponèmes et le phénomène de l'adhérence — disparitions dans la syphilis. Presse méd. 60:1719-1721, 1952.

Recebido para publicação em 15 agosto 1962.