

A REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO NA TIPIFICAÇÃO DE VÍRUS DA GRIPE ISOLADOS NO RIO DE JANEIRO ¹

J. GUILHERME LACORTE *

SUMÁRIO: O autor estudou, pela reação de fixação do complemento, amostras de vírus da gripe isoladas no Rio de Janeiro, durante a epidemia de 1973. Preparou imunesoros em hamsters pela inoculação do líquido alantóide de embriões de galinha infectados. O antígeno solúvel foi preparado com líquido obtido da mesma proveniência. As reações foram positivas, em grau variável, com as amostras clássicas PR8, FM1 e Ásia dos subtipos A0, A1 e A2 e as mais recentes A2/Hong Kong/68 e A2/England/72 e negativa com o anticorpo B/Mass/66. Para as duas variantes do subtipo A2, acima assinaladas e para as 7 amostras isoladas o comportamento foi praticamente o mesmo, não deixando de ser uma reação tipo específica se encararmos, também, as reações obtidas com as demais variantes do tipo A.

A REAÇÃO de fixação do complemento figura entre as praticadas para o diagnóstico ou tipificação do vírus da gripe. Já em 1936 Smith (4) assinalara a presença de anticorpos fixadores do complemento em indivíduos que haviam tido a gripe e, em 1937, Hoyle e Fairbrother (1) demonstraram que o soro de convalescentes tinha a mesma propriedade. O antígeno que empregaram foi obtido de pulmões de camundongos infectados. Passaram posteriormente a prepará-lo com ma-

terial colhido de membrana cório-alantóide em embriões de galinha inoculados, método que foi aperfeiçoado, em 1941, por Nigg, Crowley e Wilson (3). Antígenos semelhantes, com líquido cório-alantóide foram aconselhados, em 1954, por Lépine (2) e passaram a ser os mais usados.

As técnicas para executar-se a reação têm sido as mais diversas de acordo com as possibilidades e tendência de cada autor.

¹ Recebido para publicação em 15 de setembro de 1975.
Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Laboratório Regional da OMS para o Estudo da Gripe.

A reação é praticada, em geral, para o diagnóstico da infecção humana mas também o pode ser para o estudo de amostras de vírus isoladas em determinado local. É este o nosso caso. A partir de isolamentos que fizemos no Rio de Janeiro, tentamos verificar a formação de anticorpos com os mesmos e, posteriormente, com o soro de animais inoculados executamos a reação de fixação do complemento para assim verificar, não só a presença de anticorpos, como, ao mesmo tempo, o seu comportamento em relação aos antígenos preparados com amostras padrões. Tal é o assunto do presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras padrões de vírus empregadas foram as clássicas PR8, FM1 e Ásia dos subtipos A0, A1 e A2 e as mais recentes A2/Hong Kong/68, A2/England/72 e B/Mass/66 ao lado das isoladas no Rio de Janeiro que tiveram as seguintes designações: 1) M. Batista; 2) L. Vasconcelos; 3) M. Miranda; 4) A. Boiteux; 5) L. Silva; 6) A. Ramos; 7) I. Queirós. As amostras padrões foram provenientes do Laboratório da OMS sediado em Atlanta, EUA, à exceção da PR8 que o foi do Instituto Rockefeller de Nova York. Logo que recebidas, foram passadas em ovos embrionados de galinha e inoculadas em camundongos, o que se vem fazendo periodicamente. As amostras do Rio de Janeiro foram isoladas após a inoculação, segundo técnica adequada, dos lavados de garganta dos doentes, em ovos embrionados. Estes sempre foram usados com 11 dias de incubação a 37°C, colhendo-se o seu líquido alantóide 2 dias depois.

Os antígenos foram preparados com as 2 amostras padrões acima citadas: Hong Kong e England e da seguinte maneira: separaram-se 2 lotes de 12 ovos embrionados com 11 dias. Cada embrião dos diferentes lotes foi inoculado, na membrana cório-alantóide, com 0,05 ml de vírus padrão diluído a 10^{-3} . Colheu-se o líquido cório-alan-

tóide, de cada embrião, 2 dias após, misturando-se os pertencentes ao mesmo vírus. Tendo acusado a reação de hemaglutinação o título mínimo de 1:620 foram os mesmos considerados em condições de servir. Prosseguindo, fez-se hemaglutinação do líquido de cada lote com eritrócitos de galinha de modo que estes, depois de lavados em solução fisiológica, fossem postos na proporção de 2 por cento. Deixou-se processar a hemaglutinação em meio ambiente durante 1 hora, finda a qual foi a mistura colocada na geladeira a 4°C. Após 2 horas foi submetida à centrifugação de 3.000 rpm durante 15 minutos. O líquido sobrenadante foi usado como antígeno, uma vez que necessitávamos do antígeno solúvel.

O preparo dos anticorpos foi feito pela injeção intraperitoneal, em hamsters, das 6 amostras padrões e das que isolamos no Rio de Janeiro. Todos os vírus haviam sido inativados pelo formol a 1:1000 durante 10 dias. Cada animal recebeu 1,0 ml do líquido contendo vírus em cada uma das 4 injeções que lhe foram aplicadas, com intervalo de 5 dias entre uma e outra. Os animais foram sangrados 15 dias após a última injeção. Depois da coagulação do sangue e retração do coágulo colheu-se o soro que foi inativado em banho-maria a 56°C durante meia hora. Foram usados 5 hamsters para o preparo de cada imunesoro.

Os glóbulos de galinha, usados, foram obtidos após a sangria da ave, recebendo-se o sangue em líquido de Alsenver na proporção de 90 por cento deste. Os glóbulos foram centrifugados e lavados em solução fisiológica e conservados na geladeira a 4°C até o momento de se usarem.

Os glóbulos de carneiro foram obtidos pela sangria do animal, em jejum, recebendo-se o sangue em balões com pérolas de vidro, para desfibriná-lo pela agitação. A parte líquida foi retirada e centrifugada a 3.000 rpm durante 15 minutos, desprezando-se o líquido sobrenadante. O depósito constituído por glóbulos, foi lavado em solução fisiológica no mesmo volume do sobrenadante retirado. A operação foi repetida mais duas vezes, apresentando-se clara a solução sobrenadante. Os glóbulos foram conservados na geladeira a 4°C até

o momento de se usarem. O complemento empregado foi o do soro normal de cobaia. Obteve-se pela sangria do animal recolhendo-se o sangue em placas de Petri para facilitar a obtenção de maior quantidade de soro após a coagulação e retração do coágulo. O soro foi posto a centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos para retirarmos glóbulos e partículas grosseiras que estivessem em suspensão. O soro normal foi, então, colocado na geladeira a 4°C até o momento de usar-se. Foi empregado na diluição a 1:10 em solução fisiológica.

A hemolisina ou soro hemolítico coelho-anticarneiro foi preparado em 2 coelhos pela injeção da suspensão dos glóbulos de carneiro em solução fisiológica. Foi feita a primeira injeção na vela marginal da orelha na dose de 1,0 ml da suspensão de glóbulos sanguíneos na proporção de 1:5 em solução fisiológica, segunda injeção de 2,0 ml e terceira de 5,0 ml. As injeções seguintes foram de 5,0 ml com os glóbulos na proporção de 1:4, 1:3 e 1:2. O intervalo entre as injeções foi de 5 dias e a sangria dos coelhos feita no coração 10 dias após à última injeção. O sangue foi colocado em balão esterilizado e, após a sua coagulação e retração do coágulo, retirou-se o soro que foi posto a centrifugar durante 10 minutos a 3.000 rpm a fim de serem retirados glóbulos e partículas grosseiras em suspensão. Foi, a seguir, inativado a 56°C durante meia hora. Foi titulado segundo técnica corrente, revelando-se ativo até a diluição

1:8.000. Segundo o critério que adotamos empregou-se, nas reações, 1,0 ml da diluição 1:4.000, isto é, dose dupla.

Depois de conhecida a unidade hemolítica, o complemento foi dosado em presença do antígeno. A menor dose de complemento capaz de provocar hemólise e usando-se dose dupla de hemolisina foi considerada a unidade complementar. Nas nossas reações esta unidade foi comumente de 0,1 ml raramente 0,2 ml da solução a 1:10.

Os antígenos foram titulados quanto ao seu poder impeditivo ou hemolítico sem a presença do anticorpo, conforme o Quadro n.º 1.

Os dois antígenos que preparamos não deram qualquer poder impeditivo ou hemolítico.

A verificação da fixação do complemento pelos imunesoros obedeceu ao Quadro n.º 2.

RESULTADOS

A reação foi praticada com imunesoros que preparamos com as 7 amostras de vírus que isolamos no Rio de Janeiro e com as 6 amostras padrões já citadas. Os resultados que obtivemos vão assinalados no Quadro n.º 3. Nele se vê que os imunesoros das variantes A2/Hong Kong/68 e A2/England/72 deram idênticas reações. Houve fixação, conforme a amostra,

QUADRO 1

Antígeno	Complemento 1:10	Solução fisiológica	Banho-maria	Soro hemolítico 1:4.000	Glóbulos de carneiro a 2,5%	Banho-maria
0,1 ml	0,2 ml	1,7 ml	a 37° C	1,0 ml	0,5 ml	a 37° C
0,2 ml	0,2 ml	1,6 ml		1,0 ml	0,5 ml	
0,4 ml	0,2 ml	1,4 ml	1 hora	1,0 ml	0,5 ml	1 hora
0,4 ml	0,2 ml	2,4 ml		—	0,5 ml	

Verificação dos poderes impeditivo e hemolítico do antígeno A2/Hong Kong/68. A leitura revelou completa ausência de poder impeditivo e hemolítico. Mesmo resultado com o antígeno A2/England/72.

QUADRO 2

Imunesoro	Antígeno dosado	Comple-mento dosado	Sol. Fis.	Banho-maria	Soro hemolítico 1:400	Glóbulos de carneiro a 2,5%	Banho-maria
0,2 ml	0,2 ml	1 unidade	Completar	a	1,0 ml	0,5 ml	a
0,2 ml	0,2 ml	2 unidades	para	37°C	1,0 ml	0,5 ml	37°C 1 hora
0,2 ml	0,2 ml	3 unidades	2,0 ml	1 hora	1,0 ml	0,5 ml	
0,2 ml	0,2 ml	4 unidades			1,0 ml	0,5 ml	
0,2 ml	—	2 unidades			1,0 ml	0,5 ml	

Correspondente à técnica da reação de fixação do complemento, empregada no presente trabalho.

QUADRO 3

Imunesoro para os vírus isolados	Antígeno A2/Hong Kong/68 unidades fixadas de complemento	Antígeno A2/England/72 unidades fixadas de complemento
1	4	4
2	3	3
3	4	4
4	4	4
5	3	3
6	3	3
7	4	4
A2/Hong Kong/68	4	4
A2/England/72	4	4
A2/Ásia	2	2
A1/FM1	2	2
A0/PR8	2	2
B/Mass/66	0	0

Resultados obtidos com a reação de fixação do complemento, feita com os treze imunesoros preparados.

de 3 ou 4 unidades de complemento. Menor número de unidades, isto é, 2 unidades, com os imunesoros correspondentes às amostras PR8, FM1 e Ásia, das variantes A0, A1 e A2 do tipo A. Nenhuma fixação com o imunesoro correspondente à amostra B/Mass/66, única do tipo B que empregamos.

DISCUSSÃO

A reação de fixação do complemento é aplicada ao estudo do vírus da gripe no sentido de seguramente diagnosticar o tipo a que pertence. Segundo os autores que se têm dedicado ao assunto, não se aplica para a distinção das variantes. Verificamos, no entanto, que nos foi possível notar diferenças quantitativas entre as mesmas, no sentido de algumas delas fixarem menor número de unidades de complemento. Para estes casos somente a reação de inibição da hemaglutinação afastará as dúvidas. Outro ponto que merece reparo, no presente trabalho, é a obtenção de anticorpos em hamsters ao contrário do que usualmente se faz em galos, coelhos ou furões. Tais anticorpos foram, de fato, tipo-específicos.

SUMMARY

The complement fixation test in the typefication of influenza viruses isolated in Rio de Janeiro.

The author studied by the complement fixation test the influenza

virus strains isolated in Rio de Janeiro during the 1973 epidemic.

He prepared immunesera in hamsters by the inoculation of the allantoic fluid from infected chick embryos with each of the 7 isolated strains and the standard strains.

The soluble antigens were prepared with the allantoic fluid of infected chick embryos.

The tests were identically positive with the A2/Hong Kong/68 and A2/England/72 antigens and negative with the B/Mass/66. The tests were type specific and the behaviour of the A2/Hong Kong/68 and the A2/England/72 and the 7 strains of the isolated viruses was almost the same. They fixed 3 or 4 units of complement. The variants PR8, FM1 and Ásia fixed only 2 units of complement.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — HOYLE, L. & FAIRBROTHER, R. W., 1937, Further studies on complement fixation in influenza: antigen production in egg-membrane culture and the occurrence of a zone phenomenon. *Brit. J. Exp. Pathol.* 18:425.
- 2 — LÉPINE, P., 1954, Laboratory methods in the study of influenza virus. in *Influenza*, Monog. Ser. OMS, Geneva.
- 3 — NIGG, C., CROWLEY, J.H. & WILSON, D.E., 1941, The use of chick embryo tissues and fluid as antigens in the complement fixation reaction in influenza. *J. Immunol.* 42:51.
- 4 — SMITH, W., 1936, The complement fixation reaction in influenza, *Lancet*, 2:1256.