

IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA INTRATÍPICA DE POLIOVÍRUS PELO "MÉTODO DA COMPARAÇÃO DOS ÍNDICES DE NEUTRALIZAÇÃO" (1)

Klaus Eberhard STEWIEN (2)

STEWIEN, K. E. — Identificação sorológica intratípica de poliovírus pelo "Método da comparação dos índices de neutralização". *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 5:243-61, 1971.

RESUMO — O método da comparação dos índices de neutralização (SMIT & WILTERDINK, 1966) foi utilizado na identificação sorológica intratípica de 49 poliovírus, pertencentes aos três tipos imunológicos e isolados de casos clínicos com e sem contato conhecido com a vacina oral de Sabin. O método foi também comparado com o método de Wecker e com o marcador RCT₄₀ no estudo da identificação intratípica das estirpes do tipo 3. Os soros imunes necessários às reações de neutralização foram preparados em cobaias com as estirpes vacinais LSc2ab, P712Ch2ab e Leon 12a,b. As estirpes — dos tipos 1 e 3 — isoladas dos indivíduos sem contato conhecido com a vacina oral, foram todas identificadas como heterólogas às respectivas estirpes vacinais e as provenientes dos indivíduos com contato (recém-vacinados e contatos) foram identificadas como isólogas às respectivas estirpes vacinais, exceto duas, das quais uma (do tipo 1) foi identificada como intermediária e a outra (do tipo 3) como heteróloga. Não foi possível interpretar convenientemente os resultados das provas de identificação das estirpes do tipo 2, porque o índice de neutralização do protótipo Lansing, ao contrário dos índices das estirpes de referência dos tipos 1 e 3, não deu resultados constantes em provas consecutivas na presença do soro anti-P712Ch2ab. No estudo da identificação intratípica dos poliovírus do tipo 3, o método da comparação dos índices de neutralização forneceu resultados plenamente concordantes com os obtidos pelo método de Wecker, com isto evidenciando ser um método igualmente satisfatório e, devido à relativa simplicidade de sua técnica, melhor indicado para inquéritos epidemiológicos, quando se examina a procedência de numerosas estirpes. Os resultados obtidos com o marcador RCT₄₀ mostraram a importância de utilizar provas de diferenciação sorológica intratípica na identificação dos vírus da poliomielite em áreas de vacinação, devido à instabilidade do caráter RCT₄₀ das estirpes do tipo 3.

UNITERMOS — Poliovírus*; Estirpes vacinas*; Isolamento*; Marcadores genéticos; Marcador antigênico; Identificação sorológica intratípica; Índice de neutralização; Reversão antigênica.

Recebido para publicação em 17-8-1971.

- (1) Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.
- (2) Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. — Av. Dr. Arnaldo, 715. São Paulo, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

A vacinação contra a poliomielite, mediante o emprêgo de vírus vivos atenuados, permite controlar a ocorrência natural de poliovírus nas comunidades. A fim de que êste objetivo seja realmente alcançado, necessário se torna a realização de estudos sôbre a eliminação de vírus pelos grupos vacinados^{33, 54, 71, 87}.

Vacinas de poliovírus vivos atenuados foram pela primeira vez administradas em 1952, por KOPROWSKI⁴¹, mas verificou-se que as estirpes então utilizadas ofereciam certos riscos na vacinação em grande escala¹³. Novas estirpes atenuadas, desenvolvidas por SABIN^{67, 68, 69}, pelos Laboratórios Lederle⁸ e por KOPROWSKI⁴², mostraram possuir uma neurovirulência suficientemente baixa, para poderem ser utilizadas, com segurança, em campanhas de vacinação.

Torna-se necessário controlar se as propriedades dos poliovírus vacinais atenuados se mantêm constantes após a multiplicação no intestino das pessoas vacinadas. Estudos a respeito de certas características genéticas, a que se costuma dar o nome de *marcadores genéticos*, permitiram obter informações sôbre a estabilidade genética das estirpes vacinais, não apenas nos diferentes lotes de vacina, mas também, após a sua multiplicação no intestino humano^{2, 3}. Através de um exame sistemático de amostras de fezes das crianças e de amostras dos esgotos podemos medir a extensão da infecção devida aos vírus da poliomielite nas comunidades vacinadas, determinando se os vírus isolados provêm da vacina oral ou do reservatório natural^{10, 11, 12, 18, 19, 31, 32, 33, 34, 64, 77, 78, 79, 80, 81, 85, 86}.

Os *marcadores genéticos* mais conhecidos são os seguintes: O *marcador d*³⁷, o qual mede entre as estirpes de poliovírus virulentas e atenuadas a diferença de capacidade de formar *placas de Dulbecco* em culturas de tecido, a diferentes níveis de bicarbonato de sódio. O *marcador MS*³⁸, que mede entre as estirpes virulentas e

atenuadas a diferença de capacidade de formar *placas de Dulbecco* em uma linhagem estabelecida de células de rim de macaco rhesus. O *marcador RCT*₄₀^{5, 26, 45, 46, 47, 53, 70, 71, 75, 83, 94}, o qual mede a capacidade de multiplicação das diversas estirpes a temperaturas diferentes. O *marcador E*^{36, 91}, que mede a diferença entre as diversas estirpes de serem eluídas da resina de celulose ou do gel do hidróxido de alumínio.

Diversos estudos revelaram que os citados *marcadores* são, em maior ou menor grau, relacionados à virulência dos poliovírus, sem serem pròpriamente atributos geneticamente estáveis²³. Se bem que as estirpes vacinais apresentam *marcadores genéticos* pròprios às estirpes não virulentas, a sua descendência, multiplicando-se nos tecidos humanos, freqüentemente revelou mudanças, que puderam ser correlacionadas a um aumento de neurovirulência para o macaco^{4, 41, 43, 53, 55, 56}.

Sendo o nosso problema determinar se um vírus, proveniente de um caso de paralisia (recém-vacinado ou *contato*), origina-se de uma estirpe natural virulenta ou de um mutante virulento de uma das estirpes vacinais, a identificação baseada apenas nos citados *marcadores* não nos conduzirá ao resultado almejado.

A composição antigênica é, a exemplo das bactérias, uma característica fundamental dos vírus, constituindo a base para a sua distinção e classificação em *tipos*. Êstes tipos, por sua vez, apresentam diferenças antigênicas de menor grau, as quais permitem identificar diferentes estirpes para um mesmo *tipo*. As chamadas *estirpes de referência* do grupo dos enterovírus, por exemplo, são entidades intratípicas relacionadas entre si, que podem ser perfeitamente distinguidas umas das outras. As diferenças antigênicas entre os vírus da poliomielite são relativamente estáveis e servem como *marcadores genéticos* não relacionados à virulência.

Diferenças antigênicas entre os vírus da poliomielite foram definitivamente com-

provadas por WENNER *et al.*⁸⁹ (1956), para o tipo 2. Estes resultados foram posteriormente confirmados e estendidos para os três tipos por outros investigadores, mediante o emprêgo de diversas técnicas^{20, 30, 31, 50, 63, 88, 90}.

Alguns autores puderam verificar que variantes obtidas a partir de diversas estirpes, quando desenvolvidas no laboratório sob condições variáveis de pH e de temperatura, isto em diferentes culturas de tecido ou em animais de laboratório, não diferiam antigenicamente de suas estirpes progenitoras^{50, 56, 63, 89}. Mesmo após passagens sucessivas em culturas de tecido, contendo quantidades crescentes de sôro homólogo, McBRIDE⁵¹ (1962), pôde selecionar apenas uma pequena porcentagem de partículas de vírus sorologicamente diferentes das estirpes progenitoras. Por outro lado, o mesmo autor obteve, em relação a diversos outros *marcadores genéticos* e em condições apropriadas, mutantes com relativa facilidade.

Comparações sorológicas entre os vírus da vacina oral e a sua descendência, obtida através de passagem em voluntários, também foram realizadas por diversos pesquisadores, utilizando várias estirpes atenuadas, inclusive as da vacina de Sabin^{32, 54, 63}. De maneira geral, foi demonstrada a estabilidade antigênica da descendência, após multiplicação nos tecidos humanos, embora exceções puderam ser verificadas^{7, 12, 14, 15, 16, 57, 58, 61, 87}.

Nos anos passados foram propostas diversas técnicas para a determinação do *marcador antigênico* por WENNER *et al.*⁸⁹ (1956), McBRIDE⁵⁰ (1959), GARD³¹ (1960), WECKER⁸⁸ (1960), MELNICK⁵⁴ (1960), SMIT & WILTERDINK⁷² (1966). Nestas técnicas foram introduzidos diversos melhoramentos e algumas simplificações por PLOTKIN *et al.*⁶³ (1961), GELFAND *et al.*³³ (1962), WASSERMANN & FOX⁸⁷ (1962), WOODS *et al.*⁹² (1962), DIWAN *et al.*¹⁷ (1963), FURESZ *et al.*²⁸ (1964) e HAHNEMANN *et al.*³⁵ (1964).

A importância da identificação intratípica de estirpes de poliovírus isolados de indivíduos, obriga, naturalmente, à escolha de um ou mais métodos de simples execução. Esta razão levou-nos à escolha do método de diferenciação sorológica de SMIT & WILTERDINK⁷². Como este método somente foi utilizado na identificação intratípica das estirpes pertencentes ao tipo 1, propusemo-nos estudar sua aplicação à identificação intratípica das estirpes de poliovírus dos três tipos imunológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Culturas de células e meios de cultura. Para o isolamento das estirpes de poliovírus foram somente utilizadas culturas primárias de rim de macaco rhesus (RMK). Na preparação das culturas preferiu-se o esquema das tripsinizações sucessivas^{6, 21, 95}. Para a identificação intratípica das estirpes pela prova de SMIT e WILTERDINK e pela prova do *marcador* RCT₄₀ foram preparados tubos com culturas de células secundárias de rim de macaco rhesus. O meio de Eagle^{24, 25}, com 10% de sôro inativado de vitelo, era o meio de crescimento das células primárias e secundárias de rim de macaco rhesus. O meio de manutenção era o meio de Eagle, com apenas 2% de sôro inativado de vitelo. A base dos meios era a solução salina de Earle. Todos os meios apresentavam Gentamycin (Merck) na concentração de 5 microgramas por ml de meio.

Para a identificação intratípica das estirpes de poliovírus pela prova de Wecker preferiu-se utilizar a linhagem de células amnióticas "FL"²⁷, pela relativa facilidade com que estas células formam camadas perfeitamente confluentes em placas de plástico (tipo "disposable"). O meio de crescimento era constituído pela solução salina de Hanks, acrescida de hidrolisado de lactalbumina (Difco) a 0,5% e extrato de levedura (Difco) a 0,1%, além de 10% de sôro inativado de vitelo. Cada placa recebia 5 ml de uma suspensão de

células tripsinizadas, contendo 300.000 células por ml. As placas apresentavam um diâmetro de 6 cm. A incubação destas culturas era realizada em estufa especial, alimentada por um fluxo contínuo de ar (96%) e de gás carbônico (4%). O meio de manutenção semi-sólido era o meio de Eagle (Auto-Pow, Difco), autoclavável, contendo 1% de agar-agar (Serva). No final, o meio era suplementado com glutamina, sôro e antibióticos, segundo YAMANE et al.⁹³ (1968).

O corante vital para o reconhecimento macroscópico das placas de Dulbecco era o vermelho-neutro (Merck) na concentração de 1:12.000. O meio de diluição era o P.B.S., segundo DULBECCO²¹.

Vírus. Foram utilizadas como estirpes de referência as estirpes atenuadas LSc2ab, P712Ch2ab e Leon 12a,b, respectivamente dos tipos 1, 2 e 3 da vacina oral de Sabin, e as estirpes naturais virulentas Mahoney e HH-135 (tipo 1), Lansing (tipo 2) e Habel-24 (tipo 3). Foram examinadas 48 estirpes isoladas de crianças, com quadros clínicos semelhantes à poliomielite e outros quadros febris e uma estirpe (HHR-37) isolada de uma criança normal. A relação destas estirpes se encontra na Tabela 1.

O isolamento das estirpes de poliovírus obedeceu à técnica de KIBRICK et al.³⁹. Foram preferidos inóculos de 1 ml de suspensão das amostras de fezes e de garganta, o que permitiu alcançar uma eficiência de isolamento de poliovírus da ordem de 95% dos casos clinicamente diagnosticados como poliomielite paralítica ou não paralítica. As amostras de fezes eram preparadas de modo a se obter uma suspensão a 10% em meio de manutenção de Eagle, contendo mil unidades de penicilina a 500 microgramas de estreptomina por ml, além de 50 unidades de moronal (Mycostatin, Squibb) por ml. Antes de serem inoculadas em culturas de células primárias de rim de macaco rhesus (RMK), cultivadas em frascos de Erlenmeyer de 100 ml, as suspensões eram submetidas a

uma agitação mecânica durante cerca de 20 min e centrifugadas a 10.000 r.p.m., durante meia hora em ambiente refrigerado, para a completa sedimentação das partículas maiores. As culturas inoculadas eram incubadas a 36°C e aquelas que apresentavam um efeito citopático característico aos enterovírus, com destruição de toda camada celular, eram congeladas a -20°C, para a identificação posterior. A partir das culturas que mostravam apenas um efeito citopático discreto, efetuava-se uma passagem em células primárias de rim de macaco rhesus.

A identificação dos tipos imunológicos das estirpes isoladas foi feita pela prova de neutralização. O título dos vírus foi determinado em culturas de células secundárias de rim de macaco rhesus, utilizando-se 3 tubos por diluição. Os cálculos foram efetuados segundo o método de REED e MUENCH⁶⁵. Todas as amostras foram testadas contra um lote de 4 "pools", constituídos pelos soros anti-pólio 1 e 2, anti-pólio 1 e 3, anti-pólio 2 e 3 e anti-pólio 1, 2 e 3. Foram excluídos os casos de infecção dupla e tripla.

Soros imunes. Os soros anti-Sabin 1, 2 e 3 foram preparados em cobaias. Grupos de dez animais foram imunizados por via intraperitoneal, recebendo cada animal em 7 dias sucessivos, uma dose de um ml do vírus concentrado e purificado com trifluor-tricloroetano (Frigen 112, Hoechst). O título dos vírus era acima de 10⁸ DICT₅₀ por ml. Após um intervalo de 7 dias, os animais receberam uma dose intramuscular de 2,0 ml de uma mistura contendo um ml de vírus e um ml de adjuvante de Freund (0,1 ml de Arlacel + 0,9 ml de Bayol). Após mais um intervalo de 7 dias, cada animal recebeu uma dose intraperitoneal de um ml de suspensão de vírus. A sangria dos animais foi realizada após 7-14 dias. Os soros obtidos eram guardados a -20°C.

A prova de SMIT e WILTERDINK. Para cada estirpe a ser identificada era inicialmente preparada uma série de diluições em meio de manutenção de Eagle de 10⁻¹

TABELA 1

Relação das estirpes de poliovírus isoladas de casos clínicos, na República Federal da Alemanha, nos anos de 1967 a 1970.

Estirpe	Isolamento				Contato c/a va- cina de Sabin *	Identificação sorológica	
	Mês/ano	Local	Caso clínico	Amostra		Típica	Intra- típica**
H-26807	Mar/67	Hannover	Paralisia facial	Fezes	+	Tipo 3	-
HH-361	Mar/67	Hamburgo	Paresias	Fezes	+	Tipo 1	-
HH-395	Jul/67	Hamburgo	Meningite	Fezes	-	Tipo 1	+
HH-398	Jul/67	Hamburgo	Meningite	Fezes	-	Tipo 1	+
HH-413	Jul/67	Hamburgo	Polirradiculoneurite	Fezes	-	Tipo 1	+
HHR-37	Jul/67	Hamburgo	—	Fezes	-	Tipo 3	+
HH-447	Ag/67	Hamburgo	Meningite	Fezes	-	Tipo 2	(+)
HH-455	Ag/67	Hamburgo	Meningite	Fezes	-	Tipo 1	+
HH-458	Ag/67	Hamburgo	Meningite	Fezes	-	Tipo 2	(+)
HH-501	Ag/67	Hamburgo	Meningite	Fezes	-	Tipo 1	+
HH-503	Ag/67	Hamburgo	Meningite	Fezes	-	Tipo 1	+
HH-512	Ag/67	Hamburgo	Meningite	Garganta	-	Tipo 2	(+)
HH-550	Ag/67	Hamburgo	Meningite	Fezes	-	Tipo 1	+
HH-551	Set/67	Hamburgo	Meningite	Fezes	-	Tipo 2	(-)
H-30259	Out/67	Hannover	Meningite	Fezes	-	Tipo 3	+
HH-593	Out/67	Hamburgo	Meningite	Fezes	-	Tipo 1	+
V-50	Nov/67	Munique	Paresias	Fezes	?	Tipo 2	(-)
V-108	Nov/67	Munique	Paresias	Fezes	+	Tipo 3	-
V-237	Dez/67	Munique	Paralisia	Fezes	+	Tipo 3	-
HH-660	Dez/67	Hamburgo	Paresias	Fezes	+	Tipo 3	-
HH-681	Jan/68	Hamburgo	Febre e Rinofaringite	Fezes	C	Tipo 3	-
HH-722	Jan/68	Hamburgo	Febre; espasmos mus- culares	Fezes	+	Tipo 3	-
H-31363	Jan/68	Hannover	Paralisia	Fezes	+	Tipo 3	-
H-31733	Fev/68	Hannover	Febre; espasmos musculares	Fezes	C	Tipo 3	-
HH-849	Mar/68	Hamburgo	Meningite	Fezes	+	Tipo 3	(-)
HH-870	Mar/68	Hamburgo	Febre; espasmos mus- culares	Fezes	+	Tipo 1	±
HH-877	Abr/68	Hamburgo	Branquite espástica	Garganta	C	Tipo 2	(-)
HH-880	Abr/68	Hamburgo	Meningo-encefalite	Fezes	C	Tipo 2	(±)
HH-883	Abr/68	Hamburgo	Paresias	Fezes	-	Tipo 2	(±)
HH-891	Abr/68	Hamburgo	Febre; bronquite	Garganta	-	Tipo 2	(-)
HH-894	Abr/68	Hamburgo	Encefalite	Fezes	-	Tipo 2	(-)
HH-898	Abr/68	Hamburgo	Encefalite	Fezes	-	Tipo 2	(-)
HH-1021	Jul/68	Hamburgo	Febre; espasmos mus- culares	Fezes	-	Tipo 2	(-)
D-2025	Jul/68	Düsseldorf	Paralisia	Fezes	-	Tipo 3	+
D-2026	Jul/68	Düsseldorf	Bronquite espástica	Fezes	-	Tipo 2	(-)
V-777	Nov/68	Munique	Paresias	Fezes	?	Tipo 2	(±)
HH-2386	Dez/68	Hamburgo	Paresias	Fezes	+	Tipo 3	-
V-Fah	Dez/68	Munique	Paresias	Fezes	+	Tipo 3	-
V-886	Dez/68	Munique	Paresias	Fezes	?	Tipo 2	(±)
V-889	Dez/68	Munique	Paresias	Fezes	?	Tipo 2	(±)
V-896	Dez/68	Munique	Paresias	Fezes	?	Tipo 2	(-)
V-901	Dez/68	Munique	Paresias	Fezes	?	Tipo 2	(-)
V-1084	Dez/68	Munique	Paresias	Fezes	?	Tipo 2	(-)
HH-2525	Jan/69	Hamburgo	Paresias	Fezes	+	Tipo 3	-
HH-2530	Jan/69	Hamburgo	Bronquite espástica	Fezes	+	Tipo 3	+
HH-2546	Fev/69	Hamburgo	Bronquite espástica	Fezes	+	Tipo 3	-
HH-2804	Jul/69	Hamburgo	Paralisia	Fezes	-	Tipo 1	+
HH-2913	Ag/69	Hamburgo	Febre; espasmos mus- culares	Fezes	-	Tipo 1	+
HH-4243	Jan/70	Hamburgo	Encefalite	Fezes	+	Tipo 3	-

- + indivíduo recém-vacinado com uma dose de vacina oral trivalente;
 - indivíduo sem contato conhecido com a vacina oral;
 C indivíduo que teve contato com vacinado;
 ** () identificação das estirpes do tipo 2, sujeitas à confirmação.
 - estirpe isóloga; + estirpe heteróloga; ± estirpe intermediária.

até 10^{-8} , inclusive para as estirpes de referência. A quantidade de cada diluição era de 2 ml. De cada uma das diluições, quantidades iguais a 0,4 ml eram distribuídas em duas fileiras de tubos, dispostos em estante colocada em banho de gelo. A seguir, era adicionado a uma das fileiras igual volume de sôro imune (prêviamente descongelado) na diluição apropriada; à outra fileira de tubos era adicionado igual volume de meio de manutenção (contrôles). Realizada a distribuição dos reagentes, a estante era retirada do banho de gelo e, após uma agitação manual, colocada em banho-maria de 37°C pelo tempo de 5 min *cronometrados*. Imediatamente após esta incubação, a estante foi recolocada no banho de gelo, interrompendo-se desta forma a reação de neutralização. As misturas de vírus-sôro e os contrôles eram então ino-

culados, em quantidades de 0,2 ml, em culturas de células secundárias de rim de macaco rhesus, utilizando-se 3 tubos por diluição. A leitura das provas era realizada no final do 4.º dia de incubação a 36°C . Um efeito citopático total ou parcial era considerado como resultado positivo. Os títulos eram calculados segundo REED & MUENCH⁶⁵, sendo os mesmos expressos em valores recíprocos do logaritmo decimal. Os índices de neutralização medem a diferença entre os títulos dos vírus na presença e na ausência de sôro imune. Também foi determinada, para cada estirpe, a redução porcentual entre o índice de neutralização (IN) da estirpe testada e o índice da estirpe vacinal de referência, considerado igual a 100%, pela fórmula seguinte:

$$\text{RPIN} = \frac{\text{IN da estirpe examinada}}{\text{IN da estirpe vacinal de referência}} \times 100 =$$

Para a identificação das estirpes examinadas foi adotado o critério estabelecido por PLOTKIN et al.⁶³:

RPIN da estirpe examinada \geq RPIN da estirpe vacinal — $1/3$ (RPIN da estirpe vacinal — RPIN da estirpe natural de referência) = estirpe isóloga à vacinal (—).

RPIN da estirpe examinada \leq RPIN da estirpe vacinal — $2/3$ (RPIN da estirpe vacinal — RPIN da estirpe natural de referência) = estirpe heteróloga à vacinal (+).

RPIN da estirpe vacinal — $1/3$ (RPIN da estirpe vacinal — RPIN da estirpe natural de referência) $>$ RPIN da estirpe examinada $>$ RPIN da estirpe vacinal — $2/3$ (RPIN da estirpe vacinal — RPIN da estirpe natural de referência) = estirpe intermediária (\pm).

A prova de Wecker. Placas de Petri, apresentando camada unicelular con-

fluente, foram inoculadas com 0,2 ml das diluições das estirpes a serem testadas, incluindo as estirpes de referência. A diluição dos vírus foi prêviamente determinada para produzir 10 a 20 placas de Dulbecco, por cultura, após o 4.º dia de incubação a 36°C . Quatro culturas foram utilizadas para cada estirpe. Para a adsorção e a penetração dos vírus nas células das culturas foi determinado um tempo de 45 min a 36°C . A seguir, sem remover o sobrenadante, foram adicionados, a cada cultura, 3 ml de meio de manutenção de agar-gel, contendo o sôro imune na diluição apropriada. Paralelamente, as culturas de controle recebiam o meio de manutenção, sem sôro imune. Após a solidificação do meio de agar-gel (15 min), as culturas eram incubadas na estufa especial (Heraeus) a 36°C , durante 4 dias. No 4.º dia adicionava-se a solução de vermelho-neutro às culturas, retornando estas à estufa. No dia seguinte, determinava-se o diâmetro das placas de Dulbecco, em milímetros. Calculava-se o diâmetro médio das placas para cada estirpe, na presen-

ça e na ausência do sôro imune. No final, eram determinadas as diferenças entre os diâmetros médios de cada estirpe exami-

nada, além da razão entre êstes diâmetros, como valor percentual (Razão do tamanho médio ou %TM), pela fórmula seguinte:

$$\%TM = \frac{\text{diâmetro médio das placas na presença do sôro}}{\text{diâmetro médio das placas na ausência do sôro}} \times 100 =$$

Como uma redução total seria igual a 100%, a redução percentual do tamanho médio das placas de uma estirpe qualquer (RTM) será:

$$RTM = 100\% - \%TM$$

Para a identificação das estirpes foi adotado o critério de PLOTKIN et al.⁶³.

Técnica para a determinação do marcador RCT₄₀. Para a determinação do marcador RCT₄₀, adotou-se a técnica de BENYESH-MELNICK & MELNICK (1959)⁴. Foram determinadas, para cada estirpe estudada, as quedas de temperatura a 40°C e as respectivas reduções percentuais. O critério de identificação adotado foi o mesmo das provas sorológicas.

RESULTADOS

Os soros imunes preparados apresentaram títulos compreendidos entre 1:320 e 1:2.560, quando examinados com as estirpes homólogas. Para a identificação sorológica intratípica das estirpes desconhecidas foram somente utilizados aqueles soros cujos títulos se apresentaram iguais ou superiores a 1:640. A partir de dois ou três sôros do mesmo tipo foram preparados "pools", sendo êstes testados pelo método da comparação dos índices de neutralização com as estirpes naturais e atenuadas de referência. Os índices de neutralização das estirpes de referência dos tipos 1 e 3, mostraram-se constantes em provas consecutivas, variando apenas ligeiramente, mas de modo proporcional, os pontos finais de neutralização. Em relação às estirpes do tipo 2, o protótipo Lansing não apresentou índices de neutra-

lização constantes em provas sucessivas, na presença do sôro anti-P712Ch2ab.

Identificação intratípica dos poliovírus do tipo 1.

Os resultados da identificação sorológica intratípica dos poliovírus do tipo 1 se encontram na Tabela 2. Foram determinados os índices de neutralização (IN) para cada estirpe examinada e as reduções percentuais dos respectivos índices (RPIN), em relação ao índice da estirpe atenuada de Sabin, considerado igual a 100%. Foram calculados os limites de redução percentual segundo o critério de identificação adotado (ver em Material e Métodos).

As estirpes apresentando

- a) $RPIN \geq 76,2\%$ = estirpe isóloga à vacinal (-);
- b) $RPIN \leq 52,2\%$ = estirpe heteróloga à vacinal (+);
- c) $52,3\% \leq RPIN \leq 76,1\%$ = estirpe intermediária (\pm).

Segundo êste critério, as dez estirpes isoladas dos individuos sem contato conhecido com a vacina oral — as estirpes HH-395, HH-398, HH-413, HH-455, HH-501, HH-503, HH-550, HH-593, HH-2804 e HH-2913 — foram tôdas identificadas como heterólogas (+) à estirpe atenuada de Sabin. Das duas estirpes, isoladas das crianças após a vacinação oral, uma foi homóloga (-) à estirpe atenuada de Sabin e a outra (HH-870) foi intermediária (\pm).

TABELA 2

Identificação sorológica intratípica das estirpes de poliovírus do tipo 1, segundo o método de Smit e Wilterdink.

Estirpe	Título do vírus		IN	Redução porcentual entre os índices de neutralização	Identificação intratípica
	Sem sôro	Com sôro			
LSc-2ab	5,5	2,0	3,5	100,0	-
HH-135	5,75	4,75	1,0	28,5	+
HH-361	5,5	2,75	2,75	78,5	-
HH-395	2,25	1,5	0,75	21,4	+
HH-398	5,5	4,5	1,0	28,5	+
HH-413	5,75	4,75	1,0	28,5	+
HH-455	6,75	5,75	1,0	28,5	+
HH-501	7,5	6,5	1,0	28,5	+
HH-503	5,5	4,25	1,25	35,7	+
HH-550	5,25	3,5	1,75	50,0	+
HH-593	3,5	2,25	1,25	35,7	+
HH-870	5,75	3,5	2,25	64,2	±
HH-2804	5,5	4,25	1,25	35,7	+
HH-2913	4,5	3,5	1,0	28,5	+

Identificação intratípica dos poliovírus do tipo 2.

As estirpes isoladas dos indivíduos vacinados apresentaram *índices de neutralização* idênticos ou semelhantes ao da estirpe vacinal de Sabin, enquanto que somente algumas das estirpes isoladas de indivíduos sem contato conhecido com a vacina oral, mostraram índices de neutralização diferentes.

Identificação intratípica dos poliovírus do tipo 3.

Os resultados da identificação sorológica intratípica dos poliovírus do tipo 3 são apresentados na Tabela 3.

Foram determinados, para as estirpes examinadas, os *índices de neutralização* (IN) e as *reduções porcentuais* dos respectivos índices em relação ao índice da estirpe atenuada de Sabin, considerada igual a 100%. Segundo o critério de identificação adotado (ver capítulo anterior), as estirpes apresentando:

- a) $RPIN \geq 75,1\%$ = estirpe isóloga à vacinal (-);
- b) $RPIN \leq 50,0\%$ = estirpe heteróloga à vacinal (+);
- c) $60,1 \leq RPIN \leq 75,0\%$ = estirpe intermediária (±).

Conforme este critério, as estirpes HH-R37, H-30259 e D-2025, isoladas dos indivíduos sem contato conhecido com a vacina oral, foram identificadas como heterólogas (+) à estirpe vacinal. Com exceção de uma (estirpe HH-2530), todas as estirpes provenientes dos indivíduos após a vacinação foram identificadas como isólogas (-) à estirpe vacinal. As estirpes HH-722, HH-849, HH-2525 e HH-2530 foram isoladas nas duas primeiras semanas e as demais estirpes, nas duas semanas seguintes após a vacinação oral. As duas estirpes, provenientes dos *contatos*, foram também homólogas (-) à estirpe vacinal.

Baseado no critério de redução do tamanho das placas, foi possível, neste estudo, distinguir também pelo método de WECKER todas as estirpes estudadas, não

STEWIEN, K. E. — Identificação sorológica intratípica de poliovírus pelo "Método da comparação dos índices de neutralização". *Rev. Saúde públ., S. Paulo, 5:243-61, 1971.*

TABELA 3

Identificação sorológica intratípica das estirpes de poliovírus do tipo 3, segundo o método de Smit e Wilterdink.

Estirpe	Título do vírus		I N	Redução porcentual entre os índices de neutralização	Identificação intratípica
	Sem sôro	Com sôro			
L12a,b	6,5	3,5	3,0	100,0	-
H _{2a}	5,75	5,0	0,75	25,0	+
HHR-37	4,5	3,75	0,75	25,0	+
V-108	6,25	3,5	2,75	91,6	-
V-237	6,5	3,5	3,0	100,0	-
H-26807	6,25	3,5	2,75	91,6	-
H-30259	6,25	5,25	1,0	33,3	+
HH-660	5,5	3,0	2,5	83,3	-
HH-681	5,5	2,75	2,75	91,6	-
HH-722	6,25	3,75	2,5	83,3	-
HH-849	6,0	2,75	3,25	> 100,0	-
HH-2386	6,5	3,75	2,75	91,6	-
V-Fah	6,75	3,75	3,0	100,0	-
H-31363	5,5	2,5	3,0	100,0	-
H-31733	5,75	3,25	2,5	83,3	-
D-2025	5,75	5,25	0,50	16,6	+
HH-2525	6,5	3,5	3,0	100,0	-
HH-2530	5,5	4,75	0,75	25,0	+
HH-2546	5,5	2,0	3,5	> 100,0	-
HH-4243	6,25	3,25	3,0	100,0	-

ocorrendo estirpes intermediárias. Os resultados corresponderam sem exceção com os encontrados pela prova de Smit e Wilterdink, até mesmo em relação à estirpe HH-2530, que foi heteróloga.

Os resultados obtidos com o *marcador* RCT₄₀ são apresentados na Tabela 4. Foram determinadas para as estirpes estudadas as *quedas de temperatura* e as suas *reduções porcentuais*, em relação à estirpe vacinal (ver capítulo anterior). Segundo o critério de identificação adotado, as estirpes apresentando:

- $RP \geq 73,4\% =$ estirpe RCT₄₀-;
- $RP \leq 46,6\% =$ estirpe RCT₄₀+;
- $46,7\% \leq RP < 73,3\% =$ estirpe RCT₄₀±.

Mediante êste critério, as estirpes isoladas dos casos clínicos sem contato conhecido com a vacina de Sabin — estirpes

H-30259, D-2025 — foram RCT₄₀ +. A estirpe HH-R37, isolada da criança normal, não vacinada, foi RCT₄₀ -. Apenas três das estirpes isoladas das crianças após a vacinação e dos *contatos*, foram RCT₄₀ -, havendo dez estirpes intermediárias (RCT₄₀ ±) e duas RCT₄₀ + (HH-237 e HH-2530). A comparação destes resultados com aqueles das provas sorológicas utilizadas, encontra-se na Tabela 5.

Mediante a aplicação do *teste exato de FISCHER* (MARQUES⁴⁹, 1969) verificamos que não houve concordância entre os resultados fornecidos pelos dois métodos estudados, ao nível de significância de 1%. Utilizando o teste de MCNEMAR⁵² (1960), verificamos que a diferença entre a proporção de estirpes (-), obtidos pelos métodos de Smit e Wilterdink e a proporção de estirpes (-) obtidas pelo método do *marcador* RCT₄₀ é significativa, ao nível de 1% (Tabela 6).

STEWIEN, K. E. — Identificação sorológica intratípica de poliovírus pelo "Método da comparação dos índices de neutralização". *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 5:243-61, 1971.

TABELA 4

Identificação intratípica das estirpes de poliovírus do tipo 3, utilizando o marcador RCT₄₀

Estirpe	Título do vírus		Diferença entre os títulos a 40,0 e a 36,0°C	Redução porcentual	Caráter RCT ₄₀
	36,0°C	40,0°C			
L12a,b	6,5	2,75	3,75	100,0	-
H ₂₄	6,25	5,50	0,75	20,0	+
HHR-37	4,5	0,25	4,25	> 100,0	-
V-108	6,25	2,25	4,0	> 100,0	-
V-237	6,5	4,75	1,75	46,6	+
H-26807	6,25	3,75	2,5	66,6	±
H-30259	6,25	4,5	1,75	46,6	+
HH-660	5,75	2,5	3,25	86,6	-
HH-681	5,5	3,5	2,0	53,3	±
HH-722	5,75	3,5	2,25	60,0	±
HH-849	6,5	4,0	2,5	66,6	±
HH-2386	6,5	2,75	3,75	100,0	-
V-Fah	7,25	4,25	3,0	73,3	±
H-31363	5,5	3,25	2,25	60,0	±
H-31733	5,75	3,75	2,0	53,3	±
D-2025	5,75	4,75	1,0	26,6	+
HH-2525	6,5	4,5	2,0	53,3	±
HH-2530	6,75	5,5	1,25	33,3	+
HH-2546	5,5	3,5	2,0	53,3	±
HH-4243	6,5	3,75	2,75	73,3	±

TABELA 5

Comparação entre os resultados obtidos pelos métodos de Smit & Wilterdink, de Wecker e pelo marcador RCT₄₀, em relação às estirpes de poliovírus do tipo 3.

Estirpe	Identificação intratípica		
	Smit e Wilterdink	Wecker	RCT ₄₀
L12a,b	-	-	-
H ₂₄	+	+	+
HHR-37	+	+	-
V-108	-	-	-
V-237	-	-	+
H-26807	-	-	±
H-30259	+	+	+
HH-660	-	-	-
HH-681	-	-	±
HH-722	-	-	±
HH-849	-	-	±
HH-2386	-	-	-
V-Fah	-	-	±
H-31363	-	-	±
H-31733	-	-	±
D-2025	+	+	+
HH-2525	-	-	±
HH-2530	+	+	+
HH-2546	-	-	±
HH-4243	-	-	±

TABELA 6

Correspondência entre os resultados segundo os métodos de identificação de estirpes de poliovírus do tipo 3.

Smit e Wilterdink \ RCT ₄₀	RCT ₄₀		Total
	"Estirpes -"	"Estirpes +"	
"Estirpes -"	3	11	14
"Estirpes +"	1	3	4
Total	4	14	18

DISCUSSÃO

Como os métodos de identificação sorológica intratípica, inicialmente desenvolvidos, foram complexos e laboriosos, limitados aos laboratórios altamente especializados, houve necessidade de introduzir técnicas praticáveis em todos os laboratórios de diagnóstico da poliomielite.

Estudos a respeito da influência do período de incubação sobre a neutralização do vírus possibilitaram a WASSERMANN & FOX⁸⁷ (1962) introduzir uma modificação na prova de McBride, quanto à avaliação dos resultados, tornando-a mais facilmente aplicável à identificação e ao estudo de numerosas estirpes de poliovírus provenientes de indivíduos após a vacinação oral. Verificaram os autores que períodos de incubação de apenas 5 min, forneciam resultados mais significativos, do que períodos mais longos. Novos estudos realizados por SMIT & WILTERDINK⁷² (1966), a respeito da influência do período de incubação sobre os índices de neutralização, confirmaram as observações de WASSERMANN & FOX⁸⁷ (1962), mostrando que a diferenciação entre estirpes atenuadas e naturais alcançava valores mais significativos com um período de incubação de apenas 5 min, sendo as titulações realizadas em culturas de células de rim de macaco rhesus, mantidas em tubos. Em consequência destes resultados, SMIT & WILTERDINK⁷² (1966) introduziram um novo método de diferenciação sorológica intratípica, que teve o mérito de se distinguir dos demais métodos pela simplicidade de sua técnica, uma vez que não houve mais a necessidade de empregar o método das placas de Dulbecco, na padronização do número de placas para cada vírus examinado. Devido a isto, o *método da comparação dos índices de neutralização* é diretamente aplicável à identificação intratípica dos poliovírus isolados, do que resulta uma economia de material e de tempo. A expressão dos resultados é baseada nos *índices de neutralização* (IN) determinados por meio de titulações simultâneas dos vírus na pre-

sença e na ausência de soro imune. Como o *método da comparação dos índices de neutralização* utiliza culturas de células em tubos, em vez das culturas em frascos, ou em placas de Petri, mais exigentes no seu preparo, pode ser facilmente aplicado pelos laboratórios de Virologia. O método é menos sensível do que o de McBride na determinação de pequenas diferenças antigênicas entre estirpes de poliovírus mais próximos, entretanto, mostrou resultados concordantes com os encontrados pelo método de Wecker, na distinção entre estirpes de poliovírus de origem natural e vacinal, do tipo 1 (SMIT & WILTERDINK⁷³, 1966). No presente trabalho, também pudemos verificar uma correspondência entre os resultados dos dois métodos utilizados, desta vez na identificação intratípica de poliovírus do tipo 3.

Identificação dos poliovírus do tipo 1.

O resultado da identificação sorológica intratípica das estirpes isoladas dos casos clínicos, sem contato conhecido com a vacina oral, pelo *método da comparação dos índices de neutralização* está em plena concordância com os resultados encontrados pelos demais métodos até hoje empregados. Examinando numerosas estirpes isoladas de casos de poliomielite parálitica e não parálitica, sem contato conhecido com a vacina oral, NAKANO et al.⁵⁸ (1963) encontraram a elevada proporção de 94,5% de estirpes heterólogas à vacina de Sabin, pela prova de Wecker modificada. A única estirpe, por estes autores identificada como homóloga, pela prova de Wecker, foi heteróloga à estirpe atenuada de Sabin, pela prova de McBride. Considerando que as estirpes, por nós examinadas, foram isoladas durante o verão, estação na qual a circulação de enterovírus naturais é maior do que nas demais estações do ano, e como nessa época não houve vacinação contra a poliomielite nas áreas de isolamento, nem nas áreas adjacentes, as mesmas devem ser de origem natural.

Entre o material por nós examinado houve apenas duas estirpes provenientes de crianças após a vacinação oral, das quais uma foi homóloga (—) (HH-361) e a outra foi intermediária (\pm) (HH-870). A estirpe HH-361 foi isolada na primeira semana e a estirpe HH-870 foi isolada na segunda semana após a vacinação oral. NAKANO et al.⁵⁸ (1963), estudando mais de 100 estirpes, isoladas de indivíduos recém-vacinados num período de até 8 semanas após a vacinação oral, verificaram que a proporção de estirpes homólogas vai gradativamente decrescendo, aumentando, em consequência, a proporção de estirpes heterólogas, à medida que aumenta o tempo de isolamento após a vacinação. Na primeira semana após a vacinação, a proporção de estirpes homólogas era elevada (95,6%); na segunda semana, a proporção baixou para 71,8%; na terceira semana, a proporção era apenas de 25,5%; e, a partir da quarta semana, havia somente 11,1% de estirpes homólogas à estirpe atenuada de Sabin. Diversos outros autores também encontraram uma reversão antigênica (*antigenic drift*), se bem que em menor grau (VONKA, JANDA & TUCKOVA, 1962^{84a}; VONKA et al.⁸¹, 1962; WASSERMANN & FOX⁸⁷ 1962; WOODS et al.⁹² 1962; HAHNEMANN et al.³⁵, 1964; FURESZ et al.²⁸ 1964; KITAHARA et al.⁴⁰ 1967). Demonstrada a labilidade do caráter antigênico da estirpe atenuada de Sabin, do tipo I, após a sua multiplicação nos intestinos humanos, torna-se mais difícil a determinação da proveniência de uma estirpe desconhecida, isolada de um caso clínico. Sendo, entretanto, devidamente considerado o fenômeno da reversão e cuidadosamente interpretados os resultados das provas de diferenciação sorológica intratípica, erros maiores dificilmente poderão ser cometidos na prática. Aplicando estes conhecimentos à identificação da estirpe HH-870 (\pm), isolada na segunda semana após a vacinação oral, devemos admitir que seja uma estirpe de origem vacinal em reversão, quanto ao caráter antigênico.

Identificação intratípica dos poliovírus do tipo 2.

O fato de os resultados das reações de neutralização com a estirpe de referência *Lansing* não mostrarem reprodutibilidade (variando em nossos estudos significativamente o índice de neutralização em exames sucessivos) foi também observado por BALAYAN et al.¹ (1964), em suas investigações sobre diversas estirpes de poliovírus do tipo 2, utilizando o método de Wecker. Estes autores verificaram que diversas estirpes naturais eram facilmente neutralizadas pelo soro anti-P712-Ch-2ab e por outros soros heterólogos. Em consequência, estas estirpes eram erroneamente identificadas, quando examinadas com soros heterólogos. BALAYAN et al.¹ (1964) dividiram as estirpes examinadas em dois grupos: O grupo das estirpes facilmente neutralizáveis ("estirpes fracas") que inclui a estirpe *Lansing* e o grupo das estirpes dificilmente neutralizáveis ("estirpes fortes"). Este fenômeno assim impede a utilização do protótipo *Lansing* como estirpe de referência.

Identificação intratípica dos poliovírus do tipo 3.

Neste estudo, os métodos de Wecker e de Smit e Wilterdink forneceram os mesmos resultados de identificação. As estirpes, isoladas de indivíduos sem contato conhecido com a vacina oral, foram identificadas por ambos os métodos utilizados, como heterólogas à estirpe vacinal. Este resultado era esperado, pois as estirpes foram isoladas nos meses de verão e outono, épocas nas quais não houve vacinação nas áreas de isolamento, nem nas regiões adjacentes. As mesmas estirpes foram RCT₄₀ +, característica das estirpes naturais virulentas, exceto a estirpe isolada da criança normal (HHR-37), que foi RCT₄₀ —, certamente devido a seu caráter avirulento. Sendo este caráter RCT₄₀ — próprio das estirpes atenuadas de Sabin, a estirpe HHR-37, isolada de um indivíduo sem contato conhecido com

a vacina oral, seria erroneamente identificada, caso os resultados fossem apenas baseados no *marcador* RCT₄₀, como uma estirpe de origem vacinal. Por conseguinte, este caso serviu para mostrar a necessidade de se utilizar provas de diferenciação sorológica intratípica a fim de distinguir as estirpes vacinais das estirpes naturais.

NAKANO et al.⁵⁹ (1966), examinaram grande número (108) de poliovírus isolados de indivíduos sem contato conhecido com a vacina oral, procedentes de regiões diversas da América do Norte, encontrando pelos métodos de McBride e de Wecker modificado uma proporção de 12% de estirpes semelhantes à estirpe atenuada de Sabin. Após a aplicação de provas cruzadas, esta proporção baixou para apenas 2,5%. Esta proporção também foi encontrada por DEIBEL & McDONALD¹⁶ (1968), quando examinaram pela prova de McBride 40 estirpes naturais, mediante dois soros imunes, sendo um deles preparado com a estirpe Leon 12a₁b. A frequência da ocorrência de estirpes naturais, semelhantes às da vacina de Sabin, é de grande importância para a avaliação dos resultados das provas de identificação sorológica intratípica. Felizmente as proporções encontradas foram relativamente baixas.

As estirpes isoladas das crianças que tiveram contato com a vacina oral — recém-vacinados e *contatos* — foram, como era de se esperar, isólogas à estirpe vacinal, exceto uma, a estirpe HH-2530, que foi heteróloga. A fim de verificar a constância dos *índices de neutralização* das estirpes identificadas, em provas sucessivas, diversos exames foram repetidos uma ou duas vezes. Alterações nos índices não puderam ser encontradas, pois foram mantidas as mesmas condições experimentais. Somente foram observadas pequenas variações, que entretanto não modificaram os resultados de identificação, quando se utilizou uma outra dilui-

ção do soro ou uma nova mistura de soros.

Os resultados de identificação intratípica encontrados no presente trabalho são comparáveis aos de outros autores, utilizando os métodos de McBride e de Wecker modificado^{16, 60, 74}. NAKANO et al.⁵⁹ (1966), por exemplo, examinando 160 estirpes isoladas de indivíduos após a vacinação oral de Sabin, encontraram as elevadas proporções de 97,5% e de 96,4% de estirpes isólogas à vacinal, respectivamente, pelos métodos de Wecker e de McBride. Além disto, não houve diferença nestas porcentagens, quando as estirpes foram divididas segundo o período de isolamento, após a vacinação. Portanto, uma reversão do caráter antigênico, como foi observado para os poliovírus do tipo 1, não pôde ser constatada para os poliovírus do tipo 3. Isto facilita a identificação sorológica intratípica das estirpes isoladas de indivíduos recém-vacinados e dos seus *contatos*. O período de isolamento das estirpes por nós estudadas variou de alguns dias até quatro semanas após a vacinação. Como vimos anteriormente, todas as estirpes isoladas das crianças vacinadas foram, com exceção da estirpe HH-2530, isólogas à estirpe atenuada Leon 12a₁b. Por conseguinte, também no presente trabalho não se verificou nenhuma reversão do caráter antigênico entre os poliovírus do tipo 3.

Estudos sobre a progênie da estirpe atenuada de Sabin do tipo 3, após multiplicação intestinal, revelaram que os *marcadores* RCT₄₀ e *d* são altamente instáveis, revertendo respectivamente de RCT₄₀ — para RCT₄₀ + e de *d* — para *d* +^{5, 75, 82, 85}. Em nossos estudos, encontramos nada menos do que 10 estirpes RCT₄₀ ±, entre as 14 estirpes isólogas à vacinal, o que indica ocorrência, também no presente caso, do fenômeno da reversão do caráter RCT₄₀. Como foram identificados, pelo prova do *marcador* RCT₄₀, apenas três poliovírus semelhantes (—) à estirpe vacinal Leon

12a₁b, entre os 15 vírus provenientes de crianças vacinadas e dos seus *contatos*, verificamos, a exemplo dos referidos autores, que os resultados somente baseados nos *marcadores genéticos*, como o RCT_{40} , o *d* e o *MS*, não nos conduzirão ao resultado almejado, devido à sua instabilidade. Para verificar se os vírus isolados se originaram da estirpe vacinal ou de uma estirpe natural houve, pois, a necessidade de utilizar provas de diferenciação sorológica intratípica.

A estirpe HH-2530, identificada como heteróloga à vacinal Leon 12a₁b, pelos métodos de Wecker e de Smit e Wilterdink, foi isolada das fezes colhidas no segundo dia após a vacinação. Considerando que foi extremamente curto o espaço de tempo entre a administração da vacina e a colheita das fezes, a possibilidade de que o vírus isolado seja proveniente de uma infecção natural, anterior à vacinal, é bastante grande, uma vez que reversões significativas do caráter antigênico entre os poliovírus do tipo 3 não puderam ser constatadas^{16, 29, 59, 74}.

A realização de provas cruzadas, mediante o emprego de soros imunes preparados com a estirpe Leon 12a₁b e com a estirpe HH-2530, poderá fortalecer o resultado encontrado.

CONCLUSÕES

Em face aos resultados alcançados e discutidos neste trabalho, chegamos às seguintes conclusões:

1. Aplicado à identificação intratípica de poliovírus dos tipos 1 e 3, o método da comparação dos índices de neutralização foi eficiente na diferenciação entre as estirpes isoladas de indivíduos com contato e sem contato conhecido com a vacina oral de Sabin, sendo as mesmas identificadas, respectivamente, exceto duas, como isó-

logas e como heterólogas à estirpe atenuada de referência.

2. Comparado ao método de Wecker, num estudo de identificação intratípica de poliovírus do tipo 3, isolados de crianças após a vacinação oral de Sabin e de seus *contatos*, bem como de indivíduos não vacinados, durante épocas inter-vacinais, o método da comparação dos índices de neutralização forneceu resultados plenamente concordantes com os do método de Wecker, evidenciando ser, com isto, um método igualmente satisfatório e melhor indicado, devido à simplicidade de sua técnica, para inquéritos epidemiológicos, quando a procedência de numerosos poliovírus é examinada.
3. Comparado ao marcador RCT_{40} , na identificação intratípica de poliovírus do tipo 3, o método da comparação dos índices de neutralização evidenciou, a exemplo do método de Wecker, significativa superioridade na identificação de poliovírus semelhantes à estirpe atenuada de Sabin, Leon 12a₁b, devido à estabilidade do caráter antigênico desta estirpe após a sua multiplicação no intestino humano, em relação à labilidade do caráter RCT_{40} ; por conseguinte, também através deste trabalho, pôde-se notar a importância do emprego de métodos de diferenciação sorológica intratípica na identificação de poliovírus provenientes de indivíduos após a vacinação.

AGRADECIMENTOS

Aos Professôres Dácio de Almeida Christovão, José Alberto Neves Candeias e Ary Walter Schmid pelas valiosas sugestões oferecidas durante a elaboração do presente trabalho. À Diana Reiko Tutiya Oya e à Eunice Pinho de Castro Silva, do Departamento de Epidemiologia da

Faculdade de Saúde Pública da USP, pelo auxílio prestado na análise estatística realizada. À Prof.^a Dra. H. Lennartz, Chefe do Departamento de Virologia do Instituto de Higiene de Hamburgo, República Federal da Alemanha, e à Dra. K. Fischer pelas facilidades e sugestões proporcionadas durante o desenvolvimento da parte experimental deste trabalho.

STEWIEN, K. E. — [Intratypic serodifferentiation of polioviruses by comparison of neutralization indices]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 5:263-72, 1971.

SUMMARY — The comparison of neutralization indices (SMIT & WILTERDINK, 1966) was used for the intratypic serodifferentiation of 49 strains of poliovirus of types 1, 2 and 3, isolated from clinical cases with and without known contact with Sabin oral vaccine. This method was, as well, compared with the Wecker test and the RCT₄₀ marker, in relation to the strains of poliovirus of type 3. The immune sera used in the neutralization tests were obtained from guinea pigs inoculated with vaccine strains LSc2ab, P712Ch2ab and Leon 12a₁b. The types 1 and 3 strains isolated from cases without contact with oral vaccine were identified as heterologous to the respective vaccinal strains. All the strains isolated from cases with known contact (vaccinated and contacts) were identified as isologous to the vaccinal strains, but two, one of which (type 1) was considered as intermediate and the other (type 3) was heterologous. It was not possible to explain conveniently the results obtained in relation to type 2 strains because the neutralization indices of Lansing prototype strain by serum P712Ch2ab varied from one test to the other. The intratypic serodifferentiation of type 3 polioviruses by comparison of neutralization indices gave results comparable to the method of Wecker, showing to be a satisfactory method in view of the simplicity of its technique and particularly useful in epidemiologic surveys. The RCT₄₀ marker gave results that show the necessity of using the intratypic serodifferentiation technique when dealing with type 3 strains.

UNITERMS — Polioviruses*; Vaccine strains*; Isolation*; Identification; Genetic markers; Antigenic marker; Intratypic serodifferentiation; Neutralization index; "Antigenic drift".

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALAYAN, M. S. et al. — Study of intratypic differences between type 2 polioviruses. I. Relationship between neurovirulence, antigenicity and other properties on cells in vitro. *Virology*, 23: 125-40, 1964.
2. BEALE, A. J. et al. — Evidence on the safety and efficacy of live poliomyelitis vaccines currently in use, with special reference to type 3 poliovirus. *Bull. Wld Hlth Org.*, 40:925-45, 1969.
3. BEALE, A. J. et al. — Usol-D bac (type 3 poliovirus) vaccine studies. *Bull. Wld Hlth Org.*, 40:295-300, 1969.
4. BENYESH-MELNICK, M. & MELNICK, J. L. — The use of in vitro markers and monkey neurovirulence tests of follow genetic changes in attenuated poliovirus multiplying in the human alimentary tract. In: INTERNATIONAL CONFERENCE on LIVE POLIOVIRUS VACCINES. 1st, Washington, D.C., 1959. Washington, D.C., Pan American Health Organization, 1959. p. 179-98.
5. BENYESH-MELNICK, M. et al. — Studies of the immunogenicity, communicability and genetic stability of oral poliovaccine administered during the winter. *Amer. J. Epidem.*, 86:112-36, 1967.
6. BODIAN, D. — Simplified method of dispersion of monkey kidney cells with trypsin. *Virology*, 2:575-76, 1956.
7. BOUË, A. — Différenciation intratypique des poliovirus. Problèmes posés par l'utilisation de deux méthodes de "marquage" des poliovirus. *Arch. ges. Virusforsch.*, 18:32-46, 1966.
8. CABASSO, V. J. et al. — Cumulative testing experience with consecutive lots of oral poliomyelitis vaccine. In: INTERNATIONAL CONFERENCE on LIVE POLIOVIRUS VACCINES. 1st, Washington, D.C., 1959. Washington, D.C., Pan American Health Organization, 1959. p. 102-34.
9. CANDEIAS, J. A. N. — Isolamento e identificação intratípica de cepas de poliovírus associadas com a administração da vacina Sabin. São Paulo, 1969. p. 6. (Tese — Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Univ. São Paulo).
10. CHANG, R. S. & GEYER, R. P. — A serum albumin medium for cultivation

- of human epithelial-like cells. *J. Immunol.*, 79:455-61, 1957.
11. COSSART, Y. E. — Marker studies of poliovirus. *Nature*, 211:1432, 1966.
 12. COSSART, Y. E. — Genetic marker studies of polioviruses isolated in England and Wales. In: SYMPOSIUM EUROPEEN DE LA POLIOMYELITIS, 11^e, Rome, 1966. p. 311-8.
 13. DANE, D. S. et al. — Vaccination against poliomyelitis with live virus vaccines. *Brit. med. J.*, 1:59-74, 1957.
 14. DEIBEL, R. & MACDONALD, D. — Antigenic variations among type III poliomyelitis viruses. *N. Y. St. J. Med.*, 64:2058-65, 1964.
 15. DEIBEL, R. & HORSTMANN, W. — Virusisolerungs und Serum-differenzierungsversuche während eines Ausbruches von Kinderlähmung und nach oraler Poliomyelitis Typ-3-Impfung. *Klin. Wschr.*, 43:570-3, 1965.
 16. DEIBEL, R. & MACDONALD, D. — Serodifferentiation of type 3 poliovirus strains isolated 1960-1965 from patients and healthy vaccines; characterization of strains associated with disease in vaccinated persons and house-hold contacts. *Amer. J. Epidem.* 87:396-410, 1968.
 17. DIWAN, A. R. et al. — Antigenic analysis of polioviruses employing the disk neutralization test. *J. Immunol.*, 90: 280-7, 1963.
 18. DUBES, G. R. & CHAPIN, M. — Cold adapted genetic variants of polioviruses. *Science*, 124:586-8, 1956.
 19. DUBES, G. R. & WENNER, H. A. — Virulence of polioviruses in relation to variant characteristics distinguishable on cells in vitro. *Virology*, 4:275-96, 1957.
 20. DUBES, G. R. et al. — Antigenic variations among type 3 polioviruses. *Amer. J. Hyg.*, 70:91-105, 1959.
 21. DULBECCO, R. & VOGT, M. — Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis virus. *J. exp. Med.*, 99:167-82, 1954.
 22. DULBECCO, R. et al. — A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses. Western equine encephalitis virus and poliomyelitis virus. *Virology*, 2:162-205, 1956.
 23. DULBECCO, R. apud HODES, H. L. et al. — A physical property as a virus marker difference in avidity of cellulose resin for virulent (Mahoney) and attenuated (LSc,2ab) strain of type 1 poliovirus. In: INTERNATIONAL CONFERENCE on LIVE POLIOVIRUS VACCINES. 2nd, Washington, D.C., 1960. Washington, D.C., Pan American Health Organization, 1960. p. 47-49.
 24. EAGLE, H. — Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122: 501-4, 1955.
 25. EAGLE, H. — Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130:432-37, 1959.
 26. FOGEL, A. & PLOTKIN, S. A. — Genetic changes in attenuated poliovirus strains cultivated on human intestine in vitro. *Amer. J. Epidem.* 87:385-95, 1968.
 27. FOGH, I. & LUND, R. O. — Continuous cultivation of epithelial cell strain (FL) from human amniotic membrane. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 94:532-7, 1957.
 28. FURESZ, J. et al. — Genetic markers of poliovirus strains isolated from paralytic patients prior to and after Sabin vaccination programs. I. Studies on type 1 strains. *Amer. J. Hyg.*, 80:45-54, 1964.
 29. FURESZ, J. et al. — Genetic markers of poliovirus strains isolated from paralytic patients prior to and after Sabin vaccination programs. 2. Studies on type 3 strains. *Amer. J. Hyg.*, 80:55-61, 1964.
 30. GARD, S. — Immuno-inactivation of poliovirus. *Arch. ges. Virusforsch.*, 7:449, 1957.
 31. GARD, S. — Immunological strain specificity within type 1 poliovirus. *Bull. Wld. Hlth Org.*, 22:235-42, 1960.
 32. GARD, S. — Field and laboratory experiences with the CHAT strain type 1 poliovirus. In: INTERNATIONAL CONFERENCE on LIVE POLIOVIRUS VACCINES. 2nd, Washington, D.C., 1960. Washington, D.C., Pan American Health Organization, 1960. p. 187-201.
 33. GELFAND, H. M.; NAKANO, J. H. & COLE, J. T. — Serodifferentiation of poliovirus strains for studies of oral vaccine. *Publ. Hlth Rep.*, 77:941-5, 1962.

34. GROMAN, N. et al. — Recherches sur un variant dit "froid" du virus de la poliomyélite. *Ann. Inst. Pasteur*, 98:351-9, 1960.
35. HAHNEMAN, F. et al. — Intratypic serodifferentiation tests on polio type 1 virus strains isolated before and after vaccination with attenuated type 1 polio vaccine. *Acta path. microbiol. scand.* 61: 437-45, 1964.
36. HODES, H. L. et al. — A physical property as a virus marker. Difference in avidity of cellulose resin for virulent (Mahoney) and attenuated (LSc,2ab) strain of type 1 poliovirus. *Virology*, 11: 306-8, 1960.
37. HSIUNG, G. D. & MELNICK, J. L. — Effect of sodium bicarbonate concentration on plaque formation of virulent and attenuated polioviruses. *J. Immunol.* 80:282-93, 1958.
38. KANDA, Y. & MELNICK, J. L. — In vitro differentiation of virulent and attenuated polioviruses by their growth characteristics on MS cells. *J. Exper. Med.*, 109:9-23, 1959.
39. KIBRICK, S. et al. — An evaluation of the roller-tube tissue culture for the isolation of poliomyelitis viruses from feces. *J. Immunol.*, 75:391-400, 1955.
40. KITAHARA, T. et al. — Serodifferentiation of poliovirus strains. I. Modified Wecker test on type 1 and 2 poliovirus strains. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 20:349-76, 1967.
41. KOPROWSKI, H. et al. — Further studies on oral administration of living poliomyelitis virus to human subjects. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 82:277-80, 1953.
42. KOPROWSKI, H. — Tin Anniv. of Develop. of live virus vaccine. *J. Amer. Med. Ass.*, 174:972-6, 1960.
43. KOPROWSKI, H. et al. — Genetic markers and serological identity of wild and attenuated strains of type 1 poliovirus, with special emphasis on strains isolated from patients during an epidemic in the Belgian Congo. *Bull. Wld Hlth Organ.*, 22:243-53, 1960.
44. KOPROWSKI, H. et al. — The application of genetic markers to the development and control of live poliovirus vaccine. In: INTERNATIONAL CONFERENCE on LIVE POLIOVIRUS VACCINES. 2nd. Washington, D.C., 1960. Washington, D.C., Pan American Health Organization, 1960. p. 53-65.
45. LWOFF, A. & LWOFF, M. — L'inhibition du développement du virus poliomyélique a 39° et le problème du rôle de l'hypertermie dans l'évolution des infections virales. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 246:190-2, 1958.
46. LWOFF, A. & LWOFF, M. — Remarque sur les factures spécifiques gouvernant l'évolution des infections virales. La notion d'état critique. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 248:154, 1959.
47. LWOFF, A. & LWOFF, M. — Remarques sur quelques caractères du développement du virus de la poliomyélite. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 248:172, 1959.
48. LWOFF, A. — Factores influencing the evolution of viral diseases at the cellular level and in the organism. *Bact. Rev.*, 23:109-24, 1959.
49. MARQUES, R. M. — Teste exato de Fischer. In — *Elementos de estatística*. Campinas, Instituto Central de Matemática, 1969. cap. 23, p. 11.
50. McBRIDE, W. D. — Antigenic analysis of polioviruses by kinetic studies of serum neutralization. *Virology*, 7:45-53, 1959.
51. McBRIDE, W. D. — Variation of the antigenic character of poliovirus. *Fed. Proc.*, 21:33, 1962.
52. McNEMAR, Q. — *Psychological statistics*. 2nd ed. New York, Wiley, 1960. p. 228.
53. MELNICK, J. L. et al. — Studies on live poliovirus vaccine. *J. Amer. med. Ass.*, 171:1165-72, 1959.
54. MELNICK, J. L. — Problems associated with the use of live poliovirus vaccine. *Amer. J. publ. Hlth.*, 50:1013-31, 1960.
55. MELNICK, J. L. & BEYESH-MELNICK, M. — Problems associated with live poliovirus vaccine and its progeny after multiplication in man. Live poliovirus vaccines. In: INTERNATIONAL CONFERENCE on LIVE POLIOVIRUS VACCINES. 2nd, Washington, D. C., 1960. Washington, D.C., Pan American Health Organization, 1960. p. 12-27.
56. MELNICK, J. L. — Population genetics applied to live poliovirus vaccine. *Amer. J. publ. Hlth.*, 50:472-83, 1962.

STEWIEN, K. E. — Identificação sorológica intratípica de poliovírus pelo "Método da comparação dos índices de neutralização". *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 5:243-61, 1971.

57. NAKANO, J. H. & GELFAND, H. M. — The use of a modified Wecker technique for the serodifferentiation of type 1 polioviruses related and unrelated to Sabin's vaccine strain. I. Standardization and evaluation of the test. *Amer. J. Hyg.*, 75:363-76, 1962.
58. NAKANO, J. H. et al. — The use of a modified Wecker technique for the serodifferentiation of type 1 polioviruses related and unrelated to Sabin's vaccine strain. II. Antigenic segregation of isolates from specimens collected in field studies. *Amer. J. Hyg.*, 78:214-26, 1963.
59. NAKANO, J. H. et al. — Antigenic segregation of type 3 poliovirus isolates related and unrelated to Sabin's vaccine strain with the use of modified Wecker and McBride technique. *Amer. J. Hyg.*, 83:130-45, 1966.
60. NAKAO, C. — Antigenic characterization of poliovirus strains by neutralization kinetic studies and the modified Wecker technique. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 22: 217-33, 1969.
61. OZAKI, Y. et al. — Antigenic characterization of oral polio-vaccine progeny by neutralization kinetics. *J. Immunol.*, 90: 288-96, 1963.
62. PERKINS, F. T. & BARON, S. — Markers of attenuated poliomyelitis virus strains. In: SYMPOSIUM EUROPEËN de la POLIOMYELITE. 7th, Oxford, 1961. *Encephalite et méningite dans les infections interovirales: rapports*. Bruxelles, Association Européenne Contre la Poliomyélite, 1962. p. 316-7.
63. PLOTKIN, S. A. et al. — Intratypic serodifferentiation of polioviruses. *Virology*, 15:473-85, 1961.
64. PLOTKIN, S. A. et al. — The polioviruses of man. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 101: 357-89, 1962.
65. REED, L. J. & MUENCH, H. — A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27:493-97, 1938.
66. ROZZE, K. R. & CASEY, J. — Serodifferentiation of epidemic poliovirus strains. *Amer. J. Hyg.*, 74:332-7, 1961.
67. SABIN, A. B. — Behavior of chimpanzee-avirulent poliomyelitis viruses in experimentally infected human volunteers. *Amer. J. Med. Sci.*, 230:1-8, 1955.
68. SABIN, A. B. — Pathogenesis of poliomyelitis: the reappraisal in the light of new data. *Science*, 123:1151-7, 1956.
69. SABIN, A. B. — Properties of attenuated polioviruses and their behavior in human beings. *Spec. Publ. N. Y. Acad. Sci.*, 5: 113, 1957.
70. SABIN, A. B. — Present position of immunization against poliomyelitis with live virus vaccines. *Brit. med. J.*, 1:663-80, 1959.
71. SABIN, A. B. — Reproductive capacity of poliovirus of diverse origins at various temperatures. *Perspectives in Virology*, 2:90, 1961.
72. SMIT, G. L. & WILTERDINK, J. B. — Intratypic serodifferentiation of polioviruses by comparison of neutralization indices and correlation of the antigenic marker and monkey neurovirulence. I. Technical performance and evaluation of the method. *Arch. ges. Virusforsch.*, 18: 261-7, 1966.
73. Ibid. — II. Study of the antigenic character of Polio Type 1 strains isolated after oral vaccination. *Arch. ges. Virusforsch.*, 18:267-75, 1966.
74. SODA, K. et al. — Serodifferentiation of poliovirus strains. II. Modified Wecker test on type 3 poliovirus strains. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 22:201-16, 1969.
75. SOLOVIEV, V. D. — Problems connected with live polio vaccine. In: INTERNATIONAL POLIOMYELITIS CONFERENCE. 5th, Copenhagen, 1960. Philadelphia, Pa, J. B. Lippincott Co., 1961. p. 403-10.
76. STANLEY, N. F. et al. — Variants of *P. hominis*. V. Isolation of heat resistant variants. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 34:411, 1956.
77. TAKEMORI, N. et al. — Minute plaque mutant of type III poliovirus. *Science*, 126:924-5, 1957.
78. TAKEMORI, N. & NOMURA, S. — Mutation of poliovirus with respect to size of plaque. II. Reserve mutation of minute plaque mutant. *Virology*, 12:171-84, 1960.
79. TAKEMOTO, K. K. & HABEL, K. — Sensitivity and resistance of type 1 polioviruses to an inhibitor in certain horse sera. *Virology*, 9:228-43, 1959.

80. TAKEMOTO, K. K. & LIEBHABER, H. — Alteration of plaque morphology of EMC virus with poly-cations. *Virology*, 14: 502-4, 1961.
81. TAKEMOTO, K. K. & LIEBHABER, H. — Virus-polysaccharide interactions. II. Enhancement of plaque formation and the detection of variants of poliovirus with dextrane-sulphate. *Virology*, 17:499-501, 1962.
82. TOYOSHIMA, K. et al. — Marker test of poliovirus in relation to mass vaccination with live oral vaccines. *Biken's J.*, 6:57-72, 1963.
83. VERLINDE, J. D. & WILTERDINK, J. B. — Epidemiological and virological survey following oral administration of live polio vaccine. Live poliovirus vaccines. In: INTERNATIONAL CONFERENCE on LIVE POLIOVIRUS VACCINES. 2nd, Washington, D.C., 1960. Washington, 1960. p. 134-42.
84. VONKA, V.; JANDA, Z. & SIMON, J. — The stability of the intratypic antigenic character of Sabin's type 1 attenuated virus (LSc-2ab). *Arch. ges. Virusforsch.*, 12:7-16, 1962.
- 84a. VONKA, V.; JANDA, Z. & TUCKOVA, E. — Serological properties of antigenically different derivatives of LSc, 2ab poliovirus. *Arch. ges. Virusforsch.*, 12:285-95, 1962.
85. WALLIS, C. et al. — An aluminium marker for differentiation and separation of virulent and attenuated poliovirus. *J. exp. Med.*, 115:763-75, 1962.
86. WALLIS, C. & MELNICK, J. L. — Selection of attenuated poliovirus from virulent suspensions by heating in aluminium chloride. *Virology*, 19:483-90, 1963.
87. WASSERMANN, F. E. & FOX, J. P. — Intratypic differentiation of poliovirus strains. I. — Description of a simple method based on serum neutralization kinetics and its application to the study of human passage progeny of the LSc-2ab type 1 vaccine strain. *Arch. Pathol.*, 74:275-84, 1962.
88. WECKER, E. — A simple test for sero-differentiation of poliovirus strains within the same type. *Virology*, 10:376-9, 1960.
89. WENNER, H. A. et al. — A comparative study of type 2 poliomyelitis viruses. II. Antigenic differences relation to 18 type 2 strains. *J. Immunol.*, 77:220-31, 1956.
90. WENNER, H. A. et al. — Antigenic variations among type 1 polioviruses. A study of 16 wildtype strains and 5 variants. *Amer. J. Hyg.*, 70:66-90, 1959.
91. WOODS, W. A. & ROBBINS, F. C. — The elution properties of type 1 polioviruses from Al(OH)₃ gel. A possible genetic attribute. *Proc.nat. Acad. Sci.*, Washington, 47:1501-7, 1961.
92. WOODS, W. A. et al. — Comparison of neutralization rate and agar diffusion methods for intratypic serodifferentiation of polioviruses. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 111:401-4, 1962.
93. YAMANE, I. et al. — An autoclavable powdered culture medium for mammalian cells. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 127:335-6, 1968.
94. YOSHIOKA, I. et al. — Thermal sensitivity of polioviruses isolated during oral vaccine field trial: comparison with monkey neurovirulence. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 102:342-7, 1959.
95. YOUNGNER, J. S. — Monolayer tissue culture. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 85:202-5, 1954.