

COMPARAÇÃO DAS PROVAS DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO E DE IMUNODIFUSÃO NO DIAGNÓSTICO DA INFLUENZA

H. G. PEREIRA (1), S. TAKIMOTO (2) e L. A. RIBEIRO do VALLE (3)

RESUMO

Amostras seriadas de soros obtidos no curso de surtos de influenza humana e eqüina foram examinadas por fixação do complemento e por imunodifusão para evidenciar anticorpos correspondentes ao antígeno interno, tipo-específico do vírus da influenza A. As duas provas mostraram suscetibilidade comparável, havendo boa concordância de resultados.

A aplicação da prova de imunodifusão para o diagnóstico de rotina da influenza é sugerida, e detalhes técnicos da prova são discutidos.

INTRODUÇÃO

As provas sorológicas mais comumente empregadas no diagnóstico de rotina da influenza são as de fixação do complemento e de inibição de hemaglutinação que revelam respectivamente anticorpos para os antígenos internos (ribonucleoproteína) e de superfície (hemaglutinina). A tipo-especificidade e a curta duração dos anticorpos para a ribonucleoproteína tornam sua pesquisa particularmente útil como prova de diagnóstico, permitindo evidenciação de respostas sorológicas em períodos relativamente curtos. Esses anticorpos podem ser demonstrados não só por fixação do complemento (HOYLE & FAIRBROTHER³), como também por imunodifusão (HANA & HOYLE², STYK & HANA⁵ e SCHILD & PEREIRA⁴). Tendo esta última reação sido usada apenas em estudos limitados sobre estrutura antigênica dos vírus de influenza, propomos no presente trabalho estudar sua aplicação ao diagnóstico como prova de rotina.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígenos — Para as provas de fixação do complemento foi usado com antígeno o extrato de membranas corioalantóideas de ovos embrionados de 10 dias, inoculados com 0,1 ml de uma diluição a 10^{-4} de líquido alantóideo contendo vírus de influenza A aviária (Vírus N). As membranas foram colhidas após 48 horas de incubação a 37°C, suspensas em igual volume de solução salina (NaCl a 0,9%), congeladas e descongeladas por três vezes e centrifugadas a velocidade suficiente para sedimentar detritos celulares grosseiros. O líquido sobrenadante foi usado como antígeno.

Para as provas de imunodifusão foram empregadas suspensões de vírus preparadas a partir de líquidos alantóideos de ovos embrionados inoculados com vírus de influenza A aviária (Vírus N), eqüina (A/Equi2/São Paulo/6/69) ou humana (A2/São Paulo/101/68). Esses vírus foram concentrados por adsorção em hemácias de galinha, seguida de eluição e de centrifugação em veloci-

Trabalho realizado no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e na Secção de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa

- (1) Chefe do Departamento de Bacteriologia e Virologia do "National Institute for Medical Research", Mill Hill, London e Diretor do Centro Mundial de Influenza, da Organização Mundial de Saúde
- (2) Biologista da Secção de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil
- (3) Anteriormente Médico-Chefe da Secção de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil

dade suficiente para sedimentar as partículas de vírus que foram então suspensas em pequeno volume de solução salina, de forma a dar títulos hemaglutinantes de 1/10.000 e 1/12.000.

Soros — 1) Soros pareados humanos foram obtidos de 12 pacientes estudados no Laboratório de Respirovírus da Seção de Virologia do Instituto Adolfo Lutz durante recente epidemia comprovadamente causada pela variante "Hong Kong" do vírus da influenza do subtipo A2; 2) Soros eqüinos foram obtidos de animais dos Joquei Clube de São Paulo e do Rio de Janeiro, durante epizootia de influenza causada pelo subtipo Equi2 em julho de 1969; 3) Para controle dos antígenos usados para as provas de imunodifusão, foi utilizado um sêro de galinha imunizada com a amostra "Duck/England/62" de influenza aviária e, para as provas de fixação do complemento, foi empregado um sêro convalescente de cavalo comprovadamente infetado com influenza A/Equi2.

Fixação do complemento — As reações foram realizadas com diluições de sêro feitas em placas de "perspex" pela microtécnica de TAKATSY⁶ contra uma diluição única de antígeno contendo 4 unidades fixadoras do complemento em presença de 2 unidades de complemento. Após fixação a 4°C durante 18 horas, as placas eram colocadas a 37°C durante 30 minutos, sendo então adicionada a cada cavidade uma gota (0,025 ml) de sistema hemolítico consistindo de uma suspensão de hemácias lavadas de carneiro a 4%, previamente incubada, por 30 minutos a 37°C com uma diluição de hemolisina contendo 4 unidades hemolíticas por 0,025 ml. As placas eram reincubadas a 37°C por 30 minutos, sendo agitadas de 10 em 10 minutos. Em seguida eram levadas para geladeira onde eram mantidas à temperatura de 4°C até que as hemácias não hemolisadas fôsem sedimentadas.

Imunodifusão — Foi usada a técnica de micro-imunodifusão de CROWLE¹, incorporando-se ao ágar 1% de dodecilsulfato de sódio a fim de assegurar desintegração e dispersão dos antígenos. Na maioria das provas, a disposição dos reagentes foi a mesma da

Fig. 1, de modo que a reação de cada sêro em exame é feita ao lado da de um sêro padrão positivo, a fim de que se possa evidenciar a continuidade das linhas de precipitação. O uso de soros-padrão homólogos ou heterólogos em relação ao antígeno permite a identificação das linhas de precipitação correspondentes aos antígenos interno (RNP) e de superfície, que são respectivamente reações tipo- e subtipo-específicas.

RESULTADOS

Apresentamos nas Tabelas I e II os resultados de provas de fixação do complemento e imunodifusão realizadas com soros eqüinos e humanos. As primeiras amostras de sangue foram obtidas durante a fase aguda de infecção. Com uma única exceção (GB6), todos os cavalos mostraram elevação de anticorpos fixadores do complemento. Na maioria dos animais dos quais foram obtidas três amostras de sangue, observa-se título máximo na segunda amostra, com declínio por vezes considerável na última. Esses resultados confirmam o caráter transitório do anticorpo tipo-específico. Nota-se ainda certa

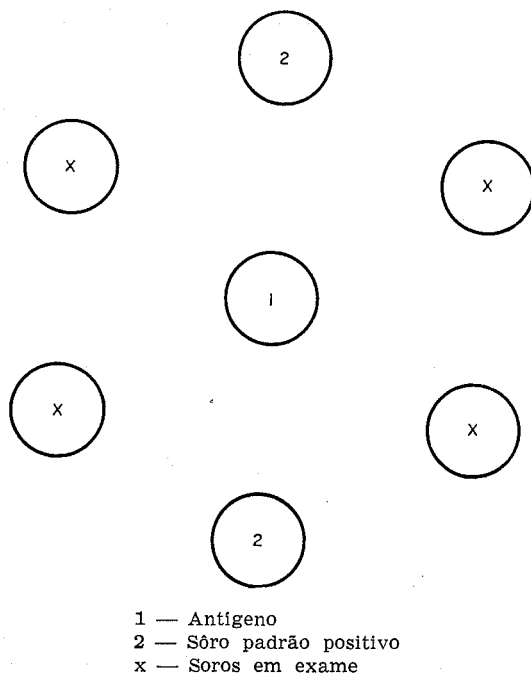


Fig. 1 — Esquema geral das provas de imunodifusão

PEREIRA, H. G.; TAKIMOTO, S. & RIBEIRO do VALLE, L. A. — Comparação das provas de fixação do complemento e de imunodifusão no diagnóstico da influenza. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:211-216, 1970.

TABELA I

Provas de fixação do complemento e de imunodifusão em soros de cavalos examinados durante epizootia causada por vírus de Influenza do subtipo A/Equi2

Identificação	Data da sangria	Fixação do complemento *	Imunodifusão **	
			Tipo-específica	Subtipo-específica ***
SP1	16-7-69	< 2	-	-
	4-8-69	24	±	-
	26-8-69	8	-	-
SP2	16-7-69	< 2	-	-
	4-8-69	32	+	+
	20-8-69	12	+	±
SP3	16-7-69	< 2	-	-
	4-8-69	128	+	-
	20-7-69	96	+	-
SP4	16-7-69	12	-	-
	4-8-69	48	+	-
	20-8-69	16	+	-
SP5	16-7-69	< 2	-	-
	4-8-69	48	+	-
	20-8-69	12	+	-
SP6	16-7-69	< 2	-	-
	4-8-69	12	±	-
	26-8-69	2	-	-
SP7	18-7-69	< 2	-	-
	4-8-69	32	+	-
	20-8-69	96	+	-
SP8	16-7-69	< 2	-	-
	4-8-69	128	+	+
	20-8-69	< 2	+	-
SP9	18-7-69	< 2	-	-
	4-8-69	256	+	-
	20-8-69	96	+	-
SP10	18-7-69	< 2	-	-
	4-8-69	24	+	-
	26-8-69	4	+	-
SP11	18-7-69	< 2	±	-
	4-8-69	256	+	-
	26-8-69	24	+	-
SP12	18-7-69	< 2	-	-
	4-8-69	256	+	±
	26-8-69	12	+	-
SP13	18-7-69	< 2	-	-
	4-8-69	16	+	-
	26-8-69	6	+	-
GB1	20-7-69	< 2	-	-
	3-8-69	> 256	+	±
GB2	20-7-69	< 2	-	-
	3-8-69	48	+	-
GB3	20-7-69	< 2	-	-
	4-8-69	> 256	+	+
GB4	20-7-69	< 2	-	-
	4-8-69	> 256	+	±
GB5	20-7-69	< 2	-	-
	3-8-69	32	+	+
GB6	20-7-69	< 2	-	-
	3-8-69	< 2	+	+

* Os números apresentados indicam recíprocas da diluição de soro, mostrando 50% de fixação do complemento

** - = Ausência de reação

± = Reação fraca indicada por inflexão de linha de precipitação dada pelo soro padrão

+ = Reação intensa

*** Especificidade indicada pela continuidade de linhas de precipitação com as dadas pelos soros-padrão homólogos e heterólogos face ao antígeno empregado

PEREIRA, H. G.; TAKIMOTO, S. & RIBEIRO do VALLE, L. A. — Comparação das provas de fixação do complemento e de imunodifusão no diagnóstico da influenza. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:211-216, 1970.

TABELA II

Provas de fixação do complemento e de imunodifusão em soros de pacientes apresentando infecção causada pela variante Hong Kong do vírus de Influenza do subtipo A2

Identificação	Amostra ****	Data da sangria	Fixação do complemento *	Imunodifusão **	
				Tipo-específica	Subtipo-específica ***
M.C.G.	A	19-2-68	12	+	-
	C	9-1-69	> 256	+	+
M.A.S.	A	14-1-69	< 2	-	-
	C	29-1-69	48	+	-
A.S.L.	A	7-3-69	< 2	-	-
	C	21-3-69	96	+	+
B.T.N.	A	7-3-69	< 2	±	-
	C	21-3-69	32	+	-
C.O.F.	A	7-3-69	12	+	-
	C	21-3-69	8	+	-
D.S.J.	A	7-3-69	< 2	-	-
	C	21-3-69	128	+	-
E.M.P.	A	7-3-69	< 2	-	-
	C	21-3-69	< 2	±	-
F.J.	A	7-3-69	< 2	-	-
	C	21-3-69	> 256	+	+
I.T.	A	7-3-69	< 2	+	-
	C	21-3-69	48	+	+
J.C.O.	A	7-3-69	< 2	-	-
	C	21-3-69	192	+	-
W.W.S.	A	7-3-69	2	±	-
	C	21-3-69	96	+	-
J.C.F.	A	12-3-69	2	+	-
	C	27-3-69	12	+	+

Legendas idênticas às da Tabela I

**** A — 1.ª amostra de soro
C — 2.ª amostra de soro

TABELA III

Correlação entre reações de fixação do complemento e imunodifusão tipo-específica

Fixação do complemento	Imunodifusão tipo-específica	Soros eqüinos	Soros humanos
Negativa	Negativa	17	6
Positiva	Positiva	28	14
Negativa	Positiva	3	4
Positiva	Negativa	3	0
T o t a l		51	24

variabilidade das respostas sorológicas em diferentes animais. A maioria dos casos humanos mostra elevação significativa de anticorpos fixadores do complemento. Excetuam-

se os pacientes E.M.P. e C.O.F., o primeiro com ausência de anticorpos demonstráveis por essa técnica em ambas as amostras de soro e o segundo com títulos baixos nas

duas amostras. Observa-se boa concordância, embora não absoluta, entre os resultados de fixação do complemento e os de imunoprecipitação, principalmente quando a última é considerada no que diz respeito às reações tipo-específicas (Tabela III). Assim, dos 51 soros de cavalos examinados, 45 mostram concordância entre essas duas reações, sendo 17 negativos e 28 positivos em ambas as

provas. Dos seis restantes, três mostraram-se positivos apenas por fixação do complemento e os outros três apenas por imunodifusão. Com os soros humanos, houve concordância em 20 casos, sendo os demais positivos apenas na prova de imunodifusão.

As reações de imunodifusão subtipo-específicas foram observadas com menor frequência, ocorrendo sempre em soros colhidos no período de convalescença.

DISCUSSÃO

Face aos resultados obtidos pode-se concluir que a prova de imunodifusão fornece resultados de sensibilidade comparável à de fixação do complemento no diagnóstico de rotina da influenza humana ou eqüina. O principal antígeno revelado por ambas essas técnicas, é a ribonucleoproteína que representa o componente interno do vírus da influenza. Sendo esse antígeno tipo-específico, isto é, comum em todos os vírus de influenza de cada tipo, torna-se desnecessário o uso de vírus homólogo nas provas de diagnóstico. Assim, infecções humanas causadas por qualquer dos subtipos de influenza A podem ser diagnosticadas mediante o uso de antígenos preparados não só com vírus humano do tipo A, mas também, com vírus de origem eqüina, suína ou aviária. Isto permite a escolha de amostras que sejam particularmente adequadas ao preparo de antígenos, tendo em vista o potencial de crescimento e a facilidade de concentração e purificação. O uso de antígenos homólogos constitui um aperfeiçoamento de técnica que permite a demonstração de anticorpos não só para a ribonucleoproteína tipo-específica mas também para os antígenos subtipo-específicos da superfície do vírus. A presente série de observações mostra que os anticorpos subtipo-específicos evidenciáveis pela técnica de imunodifusão ocorrem com pouca frequência. O seu estudo, embora de interesse acadêmico, não parece ser necessário na prática corrente, para diagnóstico de influenza. A natureza dos antígenos de superfície responsáveis pelas reações observadas no presente estudo não foi determinada, mas uma comparação dos resultados obtidos neste trabalho com os de SCHILD & PEREIRA⁴ parece

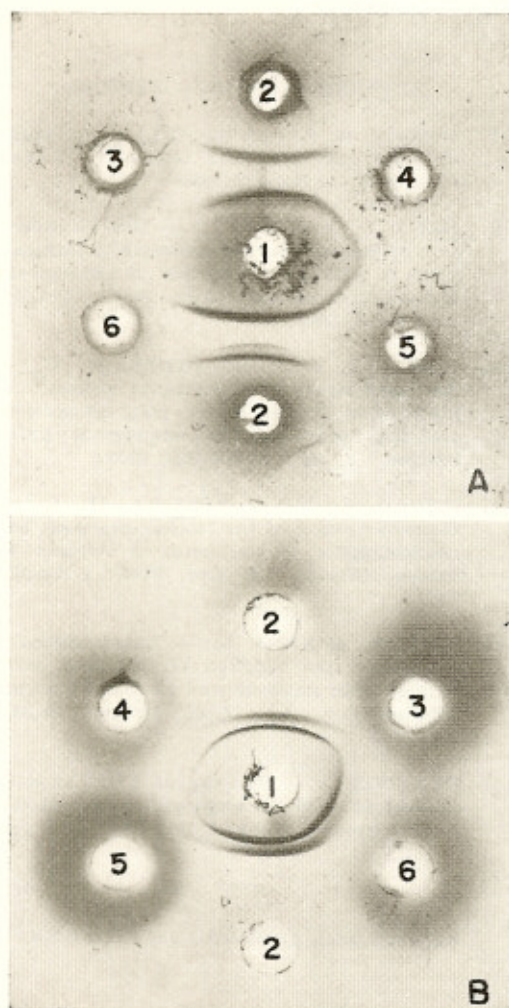


Fig. 2 — A) Provas de imunodifusão com soros eqüinos. 1 — Antígeno A/Equi2/SP/6/69; 2 — soro padrão eqüino positivo; 3, 4 e 5 — 1.^a, 2.^a e 3.^a amostras de soro; 6 — soro negativo. B) Provas de imunodifusão com soros humanos. 1 — Antígeno A2/SP/101/68; 2 — soro padrão humano positivo; 3 e 5 — 1.^a amostra de soro; 4 e 6 — 2.^a amostra de soro

indicar que se trata da neuraminidase que faz parte do envólucro do vírus, pelo menos no caso do vírus humano do subtipo A2.

Simplicidade de execução, economia de reagentes e clareza na leitura dos trabalhos tornam a prova de imunodifusão particularmente útil em trabalhos de diagnóstico e inquéritos sorológicos. Mesmo usando-se essa prova, como no presente trabalho, sob aspecto puramente qualitativo, seus resultados fornecem informação de utilidade prática.

Merece menção o fato de que os antígenos usados nessa reação eram constituídos por suspensões concentradas de partículas de vírus. Essas partículas devem ser desintegradas a fim de permitir a difusão dos componentes antigênicos através do ágar. Para obter essa desintegração utilizamos no presente trabalho o detergente dodecilsulfato de sódio previamente empregado com a mesma finalidade por SCHILD & PEREIRA⁴. Ao contrário daqueles Autores, entretanto, usamos o detergente incorporado ao ágar, em vez de adicioná-lo ao antígeno no momento da prova. Isto representa uma simplificação técnica que não afeta os resultados.

S U M M A R Y

The use of complement fixation and immunodiffusion tests on the diagnosis of influenza

Serial serum samples obtained during outbreaks of human and equine influenza were tested by complement fixation and by immunodiffusion to reveal antibodies directed to the type-specific, internal antigen of influenza A virus. The two tests showed comparable sensitivity with good agreement of results.

Application of the immunodiffusion test for the routine diagnosis of influenza is suggested

and technical details of the test are discussed.

A G R A D E C I M E N T O S

Os Autores agradecem a colaboração de Dra. Magda Mary Castelo Anraku, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Faculdade de Medicina da U.S.P., e de D. Maria Nydia de Castro, Sr. Justino da Silva e Sr. Durval Zaguetti, do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CROWLE, A. J. — A simplified micro double-diffusion agar precipitin technique. *J. Lab. Clin. Med.* 52:784-787, 1958.
2. HANA, L. & HOYLE, L. — The disintegration of the internal nucleoprotein of influenza virus A with the production of serologically distinct components. *Acta Virol.* (Prague) 10:506-512, 1966.
3. HOYLE, L. & FAIRBROTHER, R. W. — Antigenic structure of influenza viruses; The preparation of elementary body suspensions and the nature of the complement fixing antigen. *J. Hyg.* 37:512-520, 1937.
4. SCHILD, G. C. & PEREIRA, H. G. — Characterization of the ribonucleoprotein and neuraminidase of influenza A viruses by immunodiffusion. *J. Gen. Virol.* 4:355-363, 1969.
5. STYK, B. & HANA, L. — Immunodiffusion studies on the reaction of influenza virus with specific antibody and nonspecific serum beta-inhibitor. *Acta Virol.* (Prague) 10:281-290, 1966.
6. TAKATSY, G. — The use of spiral loops in serological and virological micromethods. *Acta Microbiol. Hung.* 3:191, 1955.

Recebido para publicação em 27/11/1969.