

UTILIZAÇÃO DA MICROTÉCNICA PARA A IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA INTRATÍPICA DE ESTIRPES DE POLIOVÍRUS DOS TIPOS 1 E 3

Klaus E. Stewien *
José P. G. de Lacerda **

RSPU-B/345

STEWIEN, K. E. & LACERDA, J. P. G. de *Utilização da microtécnica para a identificação sorológica intratípica de estirpes de poliovírus dos tipos 1 e 3. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 11:135-42, 1977.*

RESUMO: *Foram estudadas de modo comparativo a macro e a microtécnica em provas de identificação sorológica intratípica de 28 estirpes de poliovírus dos tipos 1 e 3, segundo o método da "comparação dos índices de neutralização". Os resultados alcançados mostraram uma correlação elevada entre os índices de neutralização obtidos com ambas as técnicas empregadas — 0,931 e 0,971 após incubação de três e cinco dias, respectivamente — e correspondência total na identificação das estirpes examinadas. Conclui-se que a microtécnica pode ser utilizada em substituição da macrotécnica tradicional na identificação intratípica de poliovírus dos tipos 1 e 3, com a vantagem da economia de meios e reagentes, e até mesmo com sensível redução de esforços humanos e tempo de execução das provas.*

UNITERMOS: *Poliovírus. Marcadores genéticos. Microtécnica.*

I N T R O D U Ç Ã O

A microtécnica tem recebido, desde a sua introdução por Takatsy e col.¹⁶ (1954), crescente aceitação nos laboratórios de Virologia. Modificada por Sever (1962), a referida técnica vem sendo empregada há vários anos em numerosos laboratórios nas reações de fixação de complemento (FC'), hemaglutinação e inibição da hemaglutinação (IH), e inibição metabólica^{9, 10}. Em 1963, foi possível a Rosenbaum e col.⁷ utilizá-la pela primeira vez na reação de soro-neutralização. Posteriormente, os referidos pesquisadores introduziram nesta reação de *microneu-*

tralização diversos aperfeiçoamentos que possibilitaram a sua utilização, tanto na dosagem de anticorpos contra diversos vírus, quanto na titulação e identificação destes mesmos vírus^{1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 11, 14, 15, 17}.

Antes do advento da microtécnica, a execução das provas de dosagem de anticorpos e de identificação de vírus era relativamente complexa, demorada e, sobretudo, dispendiosa. A realização de considerável número destas provas era tarefa de apenas alguns laboratórios bem equipados e com amplos recursos. Com a introdu-

* Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP — Av. Dr. Arnaldo, 715 — São Paulo, SP — Brasil.

** Da Seção de Vírus Respiratórios e Enterovírus do Instituto Adolfo Lutz — Av. Dr. Arnaldo, 355 — São Paulo, SP — Brasil.

ção da microtécnica, foi dada a possibilidade aos demais laboratórios de Virologia desempenhar aquela tarefa, em virtude das vantagens que ela oferece em relação à macrotécnica tradicional.

Em primeiro lugar, verifica-se uma economia de meios e reagentes, tais como, antígenos virais, anti-soros específicos, culturas de células e meios de cultura, da ordem de 10 vezes. Em segundo lugar, reduz-se sensivelmente os esforços humanos e o tempo de execução das provas. Em conseqüência, são reduzidos extraordinariamente os custos totais das reações, chegando no caso da dosagem de anticorpos neutralizantes a ser de mais de 30 vezes. Neste cálculo ainda não se inclui a economia de gastos com a lavagem, desinfecção e preparação dos diversos materiais de laboratório necessários às reações.

Mostrando-se a microtécnica útil e muito vantajosa em numerosos laboratórios de virologia, inclusive em nosso próprio, propusemo-nos, com o presente trabalho, adaptá-la à identificação sorológica intratípica de poliovírus, procurando com isto estender as suas vantagens para tal propósito.

MATERIAL E METODOS

Equipamento — O equipamento de microtitulação foi fornecido pela Firma *Cooke Engineering Co., Alexandria, Va., EUA*. Utilizaram-se para o propósito deste trabalho: 1. Microplacas de poliestireno rígido para culturas de células, apresentando 96 cavidades de fundo plano. As microplacas puderam ser utilizadas diversas vezes, quando lavadas com *Extran, Merck*. 2. Pipetas conta-gotas de polipropileno autoclavável, com capacidade total de 6 mililitros, apresentando adaptador para sucção oral e ponta de aço inoxidável, calibrada para a distribuição de gotas de 25 ou 50 microlitros. 3. Incubadora portátil para a incubação das culturas em microplaca num ambiente úmido e com 4 a 5% de gás carbônico.

Culturas de células — Foram utilizadas culturas de células da linhagem Hep-2, como alternativa das culturas primárias de rim de macaco rhesus (RMK), reconhecidamente mais dispendiosas¹³. As células Hep-2 eram cultivadas em meio de crescimento de Eagle MEM, a base da solução balanceada de Earle, contendo 10% de soro fetal bovino (Flow Laboratories, Rockville, Ma., EUA), 200 unidades de penicilina e 200 microgramas de estreptomicina por mililitro de meio. O meio de manutenção continha 2% de soro fetal bovino. Para a realização das provas, eram preparadas culturas em tubos (macro-técnica) e nas cavidades das microplacas (microtécnica). Os tubos recebiam inóculos de 1 ml de suspensões contendo cerca de 100.000 células por mililitro e as cavidades, inóculos de 0,025 ml de suspensões contendo em torno de 400.000 células por mililitro. Quando as culturas mostravam camada celular confluenta, o que ocorria após 2 a 3 dias de incubação, o meio de crescimento era substituído por meio de manutenção.

Vírus — Foram utilizadas como estirpes de referência nas provas de identificação intratípica dos poliovírus do tipo 1 e do tipo 3, respectivamente os protótipos Mahoney e Saukett e as estirpes atenuadas de Sabin LSc2ab e Leon 12a₁b. Foram examinadas 18 estirpes de poliovírus do tipo 1 e 10 estirpes do tipo 3, isolados de casos de paralisia no Instituto Adolfo Lutz¹³.

Soros imunes — Os soros anti-Sabin 1 e anti-Sabin 3 foram preparados em coelhos, segundo método anteriormente descrito¹³. Os títulos dos referidos soros hiperimunes eram 1:640 e 1:1.280, e foram utilizados nas diluições de 1:300 e 1:600, respectivamente, na execução das provas de identificação intratípica.

Provas de identificação intratípica — O método utilizado foi o da *comparação dos índices de neutralização*, descrito anteriormente em detalhe¹². As diluições dos vírus e as misturas vírus-soro imune fo-

ram preparadas em tubos esterilizados e, após um período de incubação de 5 min. (cronometrados), distribuídas nas culturas de células Hep-2. Cada diluição de vírus e cada mistura de vírus-soro era inoculada em 4 tubos de cultura e em 4 cavidades de microplaca, recebendo os tubos volumes de 0,2 ml e as cavidades, 0,1 ml. As culturas inoculadas eram então submetidas à incubação a 36-37°C. Leituras eram realizadas após 72 horas e 120 horas de incubação e os títulos calculados segundo método de Reed & Muench (1938). Para a identificação intratípica das estirpes, adotou-se o critério de Plotkin, Cohen e Koprowski (1961) ⁶.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das provas de identificação intratípica obtidos com a macro e a microtécnica são apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente para as estirpes de poliovírus dos tipos 1 e 3. Verifica-se que os índices de neutralização (IN) das estirpes de referência do tipo 1 (Makoney e LSc2ab) e do tipo 3 (Saukett e Leon 12a,b) apresentaram valores iguais ou ligeiramente diferentes entre si em ambas as técnicas utilizadas, sendo a diferença entre os índices das estirpes naturais e atenuadas praticamente igual nas provas realizadas.

Conforme o critério de identificação adotado, as estirpes de poliovírus do tipo 1 que apresentaram, após um período de incubação de 72 horas:

1. *Macrotécnica*

- a) $IN \geq 3,16 - 1/3(3,16 - 0,84) = 2,39 \rightarrow$ estirpe isóloga a vacinal (-);
- b) $IN \leq 3,16 - 2/3(3,16 - 0,84) = 1,62 \rightarrow$ estirpe heteróloga a vacinal (+);
- c) $2,39 > IN > 1,62 \rightarrow$ intermediária (\pm).

2. *Microtécnica*

- a) $IN \geq 3,00 - 1/3(3,00 - 0,66) = 2,22 \rightarrow$ estirpe isóloga a vacinal (-);
- b) $IN \leq 3,00 - 2/3(3,00 - 0,66) = 1,44 \rightarrow$ estirpe heteróloga a vacinal (+);
- c) $2,22 > IN > 1,44 \rightarrow$ intermediária (\pm).

Da mesma forma, após um período de incubação de 120 horas, as estirpes do tipo 1 que apresentaram em ambas as técnicas:

- a) $IN \geq 2,22 \rightarrow$ estirpe isóloga (-);
- b) $IN \leq 1,44 \rightarrow$ estirpe heteróloga (+);
- c) $2,22 > IN > 1,44 \rightarrow$ intermediária (\pm).

Segundo o mesmo critério de identificação, as estirpes do tipo 3 que apresentaram, após 72 horas de incubação:

1. *Macrotécnica*

- $IN \geq 2,89 \rightarrow$ estirpe isóloga (-);
- $IN \leq 2,11 \rightarrow$ estirpe heteróloga (+);
- $2,89 > IN > 2,11 \rightarrow$ intermediária (\pm).

2. *Microtécnica*

- $IN \geq 3,11 \rightarrow$ estirpe isóloga (-);
- $IN \leq 2,38 \rightarrow$ estirpe heteróloga (+);
- $3,11 > IN > 2,38 \rightarrow$ intermediária (\pm).

Da mesma forma, após um período de incubação de 120 horas, as estirpes que apresentaram:

1. *Macrotécnica*

- $IN \geq 2,94 \rightarrow$ estirpe isóloga (-);
- $IN \leq 2,22 \rightarrow$ estirpe heteróloga (+);
- $2,94 > IN > 2,22 \rightarrow$ intermediária (\pm).

TABELA 1

Resultados da identificação sorológica intratípica de poliovírus do tipo 1, segundo o método da comparação dos índices de neutralização (IN), utilizando a macrotécnica e a microtécnica

Estirpes	72 horas de incubação						120 horas de incubação						Identificação Intratípica	
	Macrotécnica			Microtécnica			Macrotécnica			Microtécnica			Macro	Micro
	Título/0,1 ml s/soro	IN	Título/0,05 ml c/soro	Título/0,05 ml s/soro	IN	Título/0,1 ml c/soro	Título/0,1 ml s/soro	IN	Título/0,05 ml c/soro	Título/0,05 ml s/soro	IN	Macro	Micro	
L Sc 2ab	4,66	3,16	2,33	5,33	3,00	2,33	5,33	3,00	5,33	2,33	3,00	-	-	
Mahoney	5,50	0,84	5,33	6,00	0,67	5,33	6,00	0,67	6,33	5,66	0,67	+	+	
AL-680/71	6,66	1,34	5,50	6,66	1,16	5,50	7,33	1,33	7,00	5,66	1,33	+	+	
AL-681/71	6,50	1,00	5,50	6,66	1,16	5,50	6,66	1,00	6,66	5,66	1,00	+	+	
AL-682/71	6,66	1,16	5,33	6,33	1,00	5,33	6,66	1,16	6,33	5,33	1,00	+	+	
AL-684/71	6,33	0,83	5,50	6,50	1,00	5,50	6,50	0,83	6,66	6,00	0,66	+	+	
AL-701/71	6,50	1,00	5,50	6,66	1,16	5,50	7,33	1,33	7,00	5,66	1,33	+	+	
AL-702/71	6,66	1,00	5,66	6,50	0,84	5,66	7,00	0,67	6,66	6,00	0,66	+	+	
AL-703/71	7,00	0,67	6,00	7,00	1,00	6,00	7,50	0,84	7,33	6,33	1,00	+	+	
AL-704/71	6,66	0,66	5,67	6,67	1,00	5,67	7,33	1,00	7,33	6,33	1,00	+	+	
AL-705/71	5,33	1,00	4,33	5,50	1,17	4,33	5,50	1,17	5,67	4,33	1,34	+	+	
AL-723/71	5,50	0,84	4,66	5,50	0,84	4,66	6,50	0,84	5,50	4,66	0,83	+	+	
AL-724/71	5,33	0,33	5,00	5,00	0,33	4,33	5,50	0,50	5,33	4,66	0,67	+	+	
AL-726/71	6,00	0,50	5,33	6,00	0,67	5,33	6,66	0,67	6,00	5,50	0,50	+	+	
AL-745/71	6,33	1,33	5,00	6,50	1,17	5,33	6,66	1,34	6,50	5,33	1,17	+	+	
AL-745/71	5,66	4,66	4,66	5,66	1,00	4,66	6,50	1,00	6,33	5,33	1,00	+	+	
AL-747/71	6,50	0,84	6,00	6,66	0,66	6,00	7,00	0,67	7,33	6,66	0,67	+	+	
AL-748/71	5,66	0,66	4,66	5,66	1,00	4,66	6,33	1,00	6,00	5,33	0,67	+	+	
AL-749/71	5,33	4,66	4,33	5,00	0,67	4,33	5,50	0,50	5,00	4,50	0,50	+	+	
AL-750/71	4,66	4,00	4,00	5,00	1,00	4,00	5,66	1,00	5,33	4,66	0,67	+	+	

TABELA 2

Resultados da identificação sorológica intratípica de poliovírus do tipo 3, segundo o método da comparação dos índices de neutralização (IN), utilizando a microtécnica e a macrotécnica

Estirpes	72 horas de incubação						120 horas de incubação						Identificação intratípica	
	Macro-técnica			Micro-técnica			Macro-técnica			Micro-técnica			Macro	Micro
	Título/0,1 ml s/soro	IN	Título/0,05 ml c/soro	IN	Título/0,05 ml s/soro	IN	Título/0,1 ml s/soro	IN	Título/0,05 ml c/soro	IN	Título/0,05 ml s/soro	IN		
Leon 12a ¹ , ^b	5,00	1,33	3,67	3,83	5,33	1,50	5,66	2,00	3,66	5,50	1,67	3,83	-	-
Saukett	5,33	4,00	1,33	1,67	5,66	4,00	6,00	4,50	1,50	5,66	4,00	1,66	+	+
AL-34A/72	3,50	1,33	2,17	2,17	3,66	1,50	4,66	2,66	2,00	4,50	2,33	2,17	+	+
AL-34B/72	3,00	1,00	2,00	1,67	3,00	1,33	4,33	2,00	2,33	4,33	2,00	2,33	+	+
AL-33A/72	3,33	1,50	1,83	2,00	3,50	1,50	3,66	1,66	2,00	3,50	1,50	2,00	+	+
AL-33B/72	3,00	1,33	1,67	1,83	3,33	1,50	3,50	1,50	2,00	3,50	1,50	2,00	+	+
AL-294/72	4,50	2,50	2,00	2,00	4,50	2,50	5,00	3,00	2,00	5,00	2,66	2,34	+	+
AL-322/72	3,50	2,00	1,50	1,17	3,50	2,33	4,33	3,00	1,33	4,00	2,50	1,50	+	+
AL-545A/73	4,66	4,33	0,33	0,33	5,00	4,67	5,50	5,00	0,50	5,33	5,00	0,33	+	+
AL-545B/73	5,33	5,00	0,33	0,33	5,33	5,00	6,50	6,00	0,50	6,00	5,50	0,50	+	+
AL-880/73	3,33	2,50	0,83	1,00	4,00	3,00	4,50	3,50	1,00	4,67	3,50	1,17	+	+
AL-39/74	4,50	2,50	2,00	2,16	4,66	2,50	5,33	3,00	2,33	5,00	2,66	2,34	+	+

2. Microtécnica

- $IN \geq 3,11 \rightarrow$ estirpe isóloga (-);
 $IN \leq 2,38 \rightarrow$ estirpe heteróloga (+);
 $3,11 > IN > 2,38 \rightarrow$ intermediária (\pm).

Verifica-se assim que todas as 28 estirpes examinadas apresentaram o mesmo resultado de identificação com ambas as técnicas utilizadas, independente do período de incubação. As 18 estirpes do tipo 1 e as 10 estirpes do tipo 3 foram identificadas como sendo heterólogas às estirpes vacinais LSc2ab e Leon 12a₁b. Como foi anteriormente descrito, este resultado era esperado, pois todas as estirpes examinadas não apresentaram associação com a vacinação oral de Sabin e procediam de casos paralíticos internados no Hospital de Clínicas da Universidade de São Paulo¹³.

A Tabela 3 mostra a concordância entre os índices de neutralização obtidos com a macro e a microtécnica, após 72 horas e 120 horas de incubação. Observa-se que a concordância entre os índices (IN) aumenta com o período de incubação, permanecendo inalterada após períodos maiores do que 120 horas (5 dias). A correlação entre os índices também se mostrou ligeiramente maior com um pe-

ríodo de incubação de 120 horas — 0,971 —, do que com um período de 72 horas — 0,931. Consequentemente, a leitura final das provas de identificação intratípica deve ser feita após um período de incubação de 120 horas para se obter uma correspondência maior entre os valores dos índices de neutralização de ambas as técnicas.

Finalmente, a Figura 1 mostra a distribuição dos índices (IN), expressos na forma logarítmica, obtidos com a macro e a microtécnica. Nota-se que os seus valores se distribuem ao longo de uma linha reta com 45 graus de inclinação.

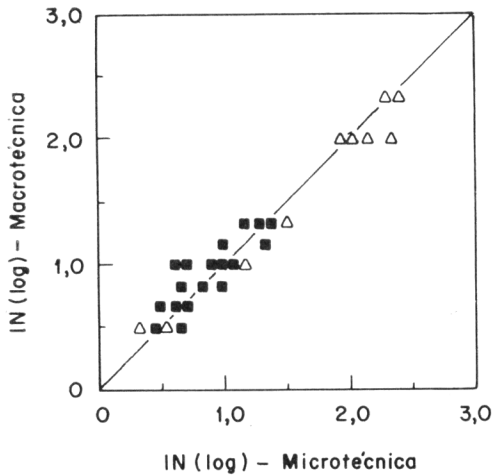
Foi possível observar no presente estudo de identificação intratípica de poliovírus dos tipos 1 e 3 as seguintes vantagens da microtécnica sobre a macrotécnica:

1. Economia de reagentes, notadamente dos soros hiperimunes anti-Sabin 1 e 3, reduzindo o seu consumo pela metade. Este consumo pode ser reduzido ainda mais, quando se diminui os inóculos das misturas vírus-soro de 0.1 ml para 0.05 ml ou mesmo para 0,025 ml.
2. Grande economia de células e, conseqüentemente, dos meios de cultivo, da ordem de 10 vezes.

TABELA 3

Concordância entre os índices de neutralização (IN) obtidos com a macrotécnica e a microtécnica

Concordância entre os IN obtidos com a macrotécnica e a microtécnica	72 horas de incubação		120 horas de incubação	
	N.º de estirpes	% de concordância	N.º de estirpes	% de concordância
Índices com diferença de 0,0-0,1 log	7	25,0	14	50,0
Índices com diferença de 0,16-0,18 log	14	50,0	11	39,3
Índices com diferença de 0,33-0,35 log	7	25,0	3	10,7
Total	28	100,0	28	100,0



LEGENDA:

- Estirpes do tipo 1
- △ Estirpes do tipo 3

Figura — Comparação entre os índices de neutralização (IN) das estirpes de poliovírus dos tipos 1 e 3, utilizando a macro e microtécnica.

3. Redução sensível dos esforços humanos e do tempo da execução das provas em mais de 2 vezes. Pela macro-técnica eram necessárias mais de 4 horas para a realização das provas

correspondentes à identificação de 10 estirpes de poliovírus. Pela microtécnica, só aproximadamente 2 horas foram necessárias.

4. Redução do tempo de leitura dos resultados em cerca de 5 vezes.

A única desvantagem da microtécnica em relação à macrotécnica reside nos gastos com a aquisição do equipamento de microtitulação, que entretanto é largamente compensada pelas vantagens mencionadas, além da economia de despesas com a lavagem, desinfecção e preparação dos diversos materiais de laboratório necessários às reações.

C O N C L U S A O

A microtécnica apresentou no presente estudo comparativo a mesma eficiência obtida com a macrotécnica na identificação intratípica de estirpes de poliovírus dos tipos 1 e 3. Os resultados de identificação encontrados com ambas as técnicas foram totalmente correspondentes e os índices de neutralização apresentaram correlação elevada. Disto se conclui que a microtécnica pode ser utilizada em substituição da macrotécnica tradicional, com as vantagens acima mencionadas.

RSPU-B/345

STEWIEN, K. E. & LACERDA, J. P. G. de [The use of the microtechnique for intratypic serodifferentiation of type 1 and 3 poliovirus strains.] *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 11:135-42, 1977.

ABSTRACTS: *The microtechnique was compared to the conventional macrotechnique for intratypic serodifferentiation of 28 type 1 and 3 poliovirus strains by the method of comparison of neutralization indices. The results of the tests showed a high correlation between the neutralization indices — 0.931 and 0.971 after incubation periods of three and five days, respectively — and all the strains were equally identified by both techniques studied. It is concluded that the microtechnique can be used as an alternative of the macrotechnique for intratypic serodifferentiation of type 1 and 3 poliovirus strains, with the advantage of economy of media and reagents and even with a marked saving in both time and effort.*

UNITERMS: *Poliovirus. Genetic markers. Microtechnique.*

STEWIEN, K. E. & LACERDA, J. P. G. de — Utilização da microtécnica para a identificação sorológica intratípica de estirpes de poliovírus dos tipos 1 e 3. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 11:135-42, 1977.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GWALTNEY, J.N. — Microneutralization test for identification of rhinovirus serotypes. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 122:1137-41, 1966.
2. HARRIS, D.J. et al. — Viruses and disease; II. An Outbreak of parainfluenza type 2 in a children's home. *Amer. J. Epidemiol.*, 87:419-25, 1968.
3. KRIEL, R.L. et al. — A microneutralization test for determination of antibodies to rubella virus. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 130:107-9, 1969.
4. MOREAU, P. & FURESZ, J. — A rapid micro tissue culture assay in BS-C.1 cells for the titration and neutralization of measles virus. *Canad. J. Microbiol.*, 13:313-9, 1967.
5. PAULS, F.P. & DOWDLE, W.R. — A serological study of herpesvirus hominis strains by microneutralization tests. *J. Immunol.*, 98:941-7, 1967.
6. PLOTKIN, S.A. et al. — Intratypic serodifferentiation of polioviruses. *Virology*, 15:473-85, 1961.
7. ROSENBAUM, M.J. et al. — A simplified method for virus-tissue culture procedures in microtitration plates. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 113:224-9, 1963.
8. SCHMIDT, N.J. et al. — A micro method for performing parainfluenza virus neutralization tests. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 122:1062-7, 1966.
9. SCHMIDT, N.J. et al. — Neutralizing, hemagglutination-inhibiting and group complement-fixing antibody responses in human adenovirus infections. *J. Immunol.*, 97:64-74, 1966.
10. SEVER, J.I. — Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.*, 88:320-9, 1962.
11. SMITH, C.B. et al. — A micro method for assay of neutralizing antibodies against parainfluenza virus type 1 and 3. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 124:4-7, 1967.
12. 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.
13. STEWIEN, K.E. & LACERDA, J.P.G. de — Aplicação do método da comparação dos índices de neutralização à identificação intratípica de poliovírus dos tipos 1 e 3, utilizando culturas de células Hep-2. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 9:221-8, 1975.
14. STOTT, E.J. & TYRRELL, D.A.J. — Some improved techniques for the study of rhinoviruses using Hela cells. *Arch. f. Virusforsch.*, 23:236-44, 1968.
15. SULLIVAN, E.J. & ROSENBAUM, M.J. — Methods for preparing tissue culture in disposable microplates and their use in virology. *Amer. J. Epidemiol.*, 85:424-37, 1967.
16. TAKATSY, G. — The use of spiral loops in serological and virological micro methods. *Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 3:191-202, 1955.
17. WULFF, H. et al. — A new microneutralization test for antibody determination and typing of parainfluenza and influenza viruses. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 125:1045-49, 1967.

Recebido para publicação em 08/09/1976
Aprovado para publicação em 10/09/1976