

ENSAIOS PRELIMINARES COM A REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO NA POLIOMIELITE *

DURVAL ROSA BORGES *
DÁCIO DE ALMEIDA CHRISTOVÃO **

Os anticorpos conhecidos e pesquisados na poliomielite — anticorpos neutralizadores e fixadores do complemento — têm significação diversa ³, servindo ambos para o melhor estudo da epidemiologia da moléstia. A pesquisa dos primeiros tem sido feita com maior freqüência pela facilidade de obtenção de soros tipo-específicos e de vírus em boas condições de viabilidade. A reação de fixação do complemento tem sido dificultada pelo preparo de抗igenos sensíveis e que funcionem em diluições adequadas.

Os trabalhos publicados sobre a reação de F.C. foram feitos com抗igenos de cérebro de camundongo ⁷ e últimamente com cultura de tecidos ¹. Através da gentileza do Dr. J. L. Melnick (Section of Preventive Medicine, Yale University School of Medicine) recebemos pequena quantidade de抗igenos deste último tipo juntamente com soros tipo-específicos. Recebemos do Dr. A. Gomes de Mattos, Diretor da Clínica Infantil do Ipiranga, algumas amostras da vacina Salk, de fabricação de Elli Lily & Comp., constituída de mistura em partes aproximadamente iguais de vírus desenvolvidos em células de rim de macaco e mortos pela formalina.

Experimentamos estes抗igenos e decidimos divulgar os resultados preliminares obtidos para que os pesquisadores interessados no assunto tomem conhecimento das dificuldades encontradas e das limitações dos métodos adotados.

MATERIAL E MÉTODOS

Os抗igenos enviados pelo Dr. J. L. Melnick eram das seguintes raças:

vírus tipo 1	Mahoney
vírus tipo 2	MEF 1
vírus tipo 3	Saukett,

sem indicações do poder fixador. Os soros enviados já na diluição de 1:5 e contendo preservativo, tinham os seguintes títulos neutralizadores:

Recebido para publicação em 30-6-1956.

* Trabalho da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas (Prof. Lucas de Assumpção) da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

** Assistentes da Cadeira.

anti-sôro 1	10.000 ou maior
anti-sôro 2	1.000
anti-sôro 3	10.000.

A técnica usada por Melnick¹, baseada no método de Fulton e Dumbell², adota placas especiais e distribui os diversos elementos da reação em gôtas padronizadas. Por não dispormos de material nem de experiência para esta técnica preferimos usar a de Wadsworth, Maltaner e Maltaner³ com as modificações de N. Y. State Dep. of Health — Division of Lab. and Research — para F. C. nas viroses e ricketssioses⁴, com a diferença apenas que a incubação para hemólise foi de 15 mins. e usados $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ dos volumes originais.

O motivo de usarmos êstes volumes foi o de economia dos抗ígenos. Com $\frac{1}{4}$ das doses originais da reação de Maltaner aproximamo-nos da dose de técnica em gôtas (0.025 ml para 0.020 ml) com a vantagem de trabalharmos com tubos, evitando o dessecamento que atua nas placas abertas.

Para titulações preliminares dos抗ígenos usamos $\frac{1}{2}$ dos volumes, fazendo a leitura de % de hemólise, e nas reações usamos $\frac{1}{4}$ dos volumes, mas neste caso lendo a fixação em cruzes (+++, ++, + e —) para evitar erros devido à pequena quantidade dos elementos.

Esquemas da reação e titulação

	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$
sôro inativado a 60°C — 20 mins.	0.025 ml	0.0125 ml
antígeno	0.05	0.025
complemento (3 unidades 50%)	0.05	0.025
salina	0.025	0.0125
incubação para fixação — 20 horas — 4°C		
eritrócitos sensibilizados	0.1	0.05
incubação para hemólise — 15 mins. — 37°C		

Os soros experimentados foram os enviados pelo Dr. J. L. Melnick, tipo-específicos (P1, P2 e P3), quatro soros de crianças com formas paralíticas de poliomielite, internadas no Hospital das Clínicas (Prof. Godoy Moreira), (A, B, C e D) e ainda dois soros de adultos sem história da moléstia, 1 e 2. As diluições usadas estão indicadas no protocolo, e foram feitas com salina a 0.85 g%.

Foram incluídos controles com 1, 2 e 3 unidades 50% de complemento com as diluições do antígeno, dos soros e apenas do complemento.

RESULTADOS

A titulação dos抗ígenos feita com os respectivos soros mostrou que o抗ígeno 1 não mostrou poder fixador mesmo na primeira diluição, de 1:4, o抗ígeno 2 fixou levemente apenas no primeiro tubo e o sôro P3 se mostrou anti-complementar prejudicando a leitura. Os outros dois soros — P1 e P2 — bem como as diluições dos 3抗ígenos não mostraram ação inibidora sobre o complemento (Quadro n.º 1).

QUADRO N.º 1 — Tentativa de titulação dos抗ígenos

TITULAGENS																							
ANTÍGENO 1					ANTÍGENO 2					ANTÍGENO 3													
SÓRIO	1/4	1/8	1/16	1/32	C ₁	C ₂	C ₃	SÓRIO	1/4	1/8	1/16	1/32	C ₁	C ₂	C ₃	SÓRIO	1/4	1/8	1/16	1/32	C ₁	C ₂	C ₃
P ₁	100	100	100	100	80	100	100	P ₂	80	100	90	100	40	70	100	P ₃	60	60	50	60	40	50	60
1:5	100	100	100	100				1:5	80	100	90	100				1:5	60	60	50	60			
1:10	100	100	100	100				1:10	90	90	90	100				1:10	40	30	50	50			
1:20	100	100	100	100				1:20	90	100	100	100				1:20	30	30	90	40			
1:40	100	100	100	100				1:40	100	100	100	100				1:40	20	30	30	30			
	10	20	40						20	10	30						20	40	50				
	100	100	100						100	100	100						100	100	100				
	C ₁	C ₂	C ₃						C ₁	C ₂	C ₃						C ₁	C ₂	C ₃				

Diante do pequeno poder fixador dos抗ígenos ensaiamos os soros restantes e diluições com抗ígenos não diluidos. O quadro n.º 2 resume o conjunto de provas e controles e leituras obtidas (Quadro n.º 2).

QUADRO N.º 2

SÓROS															
A				B	C	D	1	2	P ₁	P ₂	P ₃	C ₁	C ₂	C ₃	
DILS	1/4	1/8	1/16		1/4	1/8	1/4	1/8	1/16	1/5	1/10	1/20	1/5	1/10	1/20
I	1:1	+++	++	+	—	+	+	+	—	+++	+	+	++	++	+
	1:2	++			—	—	—	—	—	++			++	++	
	1:4	+			—	—	—	—	—	—			++	++	
II	1:1	++	—	—	+	—	—	—	—	+++	++	—	++	++	+
	1:2	+			—	—	—	—	—	++			++	++	
	1:4	+			—	—	—	—	—	++			++	++	
III	1:1	+	—		—	—	—	—	—	++	+	—	++	++	+
	1:2	—			—	—	—	—	—	++	++		++	++	
	1:4	—			—	—	—	—	—	++	++		++	++	
C ₁	++	+++			++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
C ₂	+	+			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
C ₃	—	—			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
ANTÍGENOS										* Inativação α 56°C-20 mins					
C _{1,2} e 3 Tubos com 1,2 e 3 unidades 50% de C'										* C ₁ C ₂ C ₃					
										P ₃ 1/5 +++ ++ +					

Estes resultados parecem indicar que na incubação longa de 20 horas e nas pequenas doses usadas o complemento se deteriora com mais facilidade do que na reação original ou mesmo na titulação feita com metade dos volumes, onde os tubos com duas unidades de complemento forneceram e fornecem hemólise completa. Os抗ígenos que na titulação não se mostraram anti-complementares na diluição de 1:4, na reação com $\frac{1}{4}$ do volume inibiram o complemento.

O sôro P3 se mostrou menos anti-complementar quando inativado a 56°C, mas de algum modo prejudicando ainda os resultados.

Desprezando as fixações leves (+) vemos que o sôro A foi positivo a 1:8 com o antígeno 1 e a 1:4 com o antígeno 2 e negativo com o antígeno 3. Os soros B e C foram negativos com os três e o sôro D foi positivo até 1:8 exclusivamente com o antígeno 1. Dos sôros tipo-específicos o P1 foi positivo apenas com o antígeno homólogo, mesmo com este diluído a 1:2; o P2 fixou com o antígeno homólogo até 1:8, deu reação cruzada com o antígeno 1 e negativou com o 3; e finalmente o sôro P3 foi positivo até 1:20 com o mesmo antígeno. Os sôros controles-negativos foram negativos sem qualquer diluição e com os três antígenos.

Quanto à possibilidade de determinação sorológica do tipo de vírus sómente pesquisas mais completas poderão informar, embora um caso como o do sôro D sugira que se trate de infecção pelo vírus tipo 1.

A vacina Salk não mostrou poder fixador mesmo sem diluir e em presença de sôros puros.

Parece-nos que a reação de Maltaner feita com $\frac{1}{4}$ dos volumes da técnica original, servindo ao princípio indispensável de economia de antígeno, é praticável e pode substituir as técnicas em gôtas, cuja única vantagem é a economia.

As omissões no quadro foram motivadas pela escassez dos抗ígenos. Desde que disponhamos de novas partidas de抗ígenos reiniciaremos as pesquisas, completando os dados iniciais aqui fornecidos e orientando-as para as finalidades epidemiológicas e clínicas em que a reação de F. C. na poliomielite pode ser de utilidade.

RESUMO

Os AA. ensaiaram a reação de fixação do complemento pela técnica de Wadsworth, Maltaner e Maltaner, com $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ dos volumes originais, com抗ígenos dos vírus de poliomielite e em presença de sôros imunes, de doentes com formas paralíticas e de controles presumivelmente negativos.

Os resultados indicam a praticabilidade da reação nos volumes usados e a presença de anticorpos fixadores do complemento em algumas das amostras.

SUMMARY

The AA. used the Wadsworth, Maltaner & Maltaner technic with $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ of volumes ordinarily used in a complement fixation test with poliovirus antigens and immune and control sera. The results show the practicability of the method and some fixation in some of the samples.

REFERÊNCIAS

1. Black, F. L. & Melnick, J. L.: The specificity of the complement fixation test in poliomyelitis. *Yale J. Biol. & Med.* **26**:385, 1954.
2. Fulton, F. & Dumbell, K. R.: The serological comparison of strains of influenza virus. *J. Gen. Microbiol.* **3**:97, 1949.
3. Goldblum, N. & Melnick, J. L.: Complement fixing antibodies to type 2 (Lansing) poliomyelitis virus in a normal population of a subtropical area. *J. Exper. Med.* **96**:175-185, 1952.
4. Le Bouvier, J. L.: Observation of the poliomyelitis complement fixation test. *Brit. J. Exper. Path.* **34**:300-318, 1953.
5. New York State Department of Health. Division of Laboratory and Research: Standard Methods. 3rd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1947. p. 361-465.
6. ——: Complement fixation test with virus and rickettsial antigens. [7]p. [1955] (Cópia mimiografada).
7. Smedivyr, A.; Enders, J. F. & Holloway, A.: Complement fixation with Brunhilde and Lansing poliomyelitis viruses propagated in tissue culture. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **79**:293-300, 1952.