

A REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO NO ESTUDO DO VÍRUS DA GRIPE ASIÁTICA *

**J. GUILHERME LACORTE, ESTÁCIO MONTEIRO
e J. CARVALHO LOURES ****

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara

Dentre as reações que se destacam no estudo da infecção gripal e do seu agente, figuram a da inibição da hemaglutinação e a da fixação do complemento. A primeira, mais largamente utilizada, sobretudo devido à maior facilidade de execução, tem sido por nós praticada em inúmeros trabalhos anteriores, sendo o último deles referente às amostras do vírus A2 da gripe asiática que isolamos, em primeiro lugar, do Rio de Janeiro, em nosso laboratório do Instituto Oswaldo Cruz, no decorrer da pandemia de 1957, assim como de várias localidades do Brasil, conforme publicações no momento divulgadas. O presente trabalho constituirá uma seqüência daqueles outros, uma vez que estudamos algumas das citadas amostras, empregando, agora, a segunda das provas, que acima enumeramos, a da reação de fixação do complemento.

Pouco após a descoberta do vírus da gripe, SMITH assinalou, em 1936, a presença dos anticorpos fixadores do complemento no sôro de pessoas que haviam tido a doença, enquanto HOYLE & FAIRBROTHER demonstraram, em 1937, que o sôro de convalescentes e de indivíduos normais fixavam especificamente o complemento, em presença de antígenos preparados pela utilização de pulmões de camundongos experimentalmente inoculados. Posteriormente, prepararam antígenos com a membrana cório-alantóide de embriões de galinha infectados, método que NIGG, CROWLEY & WILSON (1941) aperfeiçoaram. Os antígenos passaram, depois desses autores, a ser preferentemente preparados a partir do líquido alantóide, contendo determinada quantidade de vírus evidenciada pela reação de hemaglutinação. Têm sido inúmeras e bastante diversas, de acôrdo com a época e tendências dos autores, as técnicas que se apresentaram para a execução dessa prova, devendo a nossa preferência dirigir-se à que fornecer melhores resultados, conforme a finalidade em vista.

* Recebido para publicação a 21 de janeiro de 1960.

** Bolsista do Instituto Oswaldo Cruz (Divisão de Higiene).

A reação de fixação do complemento, como a da hemaglutinação, é quase sempre praticada para diagnóstico da infecção gripal, assinando, ao mesmo tempo, o vírus que a provoca. Em tais casos, torna-se imprescindível fazer, pelo menos, duas provas, com intervalo de alguns dias, a fim de perceber-se o aumento no título de anticorpos. Poderá, ainda, servir para identificação do vírus isolado, uma vez que o laboratório possua os soros padrões. Finalmente, aplica-se menos em outros casos, em que se deseja estudo mais apurado das amostras de vírus isoladas, como o de que tratamos no presente trabalho, em que a praticamos para estabelecer as relações entre os antígenos de amostras padrões com soros preparados em nosso laboratório, pela inoculação das amostras que isolamos. Concomitantemente, foi também executada com soros preparados com as amostras padrões.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de vírus empregadas foram a PR8 e a Weiss para o tipo A, a FM1 para a variante A1, e a Japão para a variante A2 e a Lee para o tipo B. As amostras submetidas a exame, em número de 17, já haviam sido anteriormente identificadas como pertencentes à variante A2 pela prova de inibição da hemaglutinação e foram por nós isoladas no decorrer da epidemia de gripe asiática em nosso país, conforme referimos. No Quadro 1 vêm catalogadas, de acôrdo com a proveniência.

QUADRO 1

FICHA N.º	Data	NOME	Proveniência
13.....	28- 8-57	Sonia L.	Rio de Janeiro
14.....	28- 8-57	Francisca C.	» » »
15.....	28- 8-57	Franca A.	» » »
19.....	30- 8-57	Fulvia R.	» » »
24.....	3- 9-57	Paulo A.M.	» » »
32.....	5- 9-57	Maria R.S.	» » »
34.....	5- 9-57	Ronaldo O.P.	» » »
43.....	12- 9-57	Octavio C.	» » »
44.....	12- 9-57	Arnaldo P.M.	» » »
45.....	12- 9-57	Rangel F.F.	» » »
51.....	16- 9-57	Dulce S.M.	Petrópolis
58.....	18- 9-57	Aldo D.V.	Natal
66.....	25- 9-57	Irmã H.M.R.	Recife
76.....	1-10-57	Heraldo L.F.	Volta Redonda
78.....	1-10-57	José L.G.	» »
80.....	1-10-57	Aurilio M.M.	» »
84.....	2-10-57	Nilber S.R.	Campos

Para o preparo dos antígenos, foram as diferentes amostras inoculadas em embriões de galinha de 11 dias de idade, colhendo-se, o líquido alantóide, 48 horas depois e logo o conservando na geladeira. Terminadas essas inoculações e colheitas, foi o líquido, depois de alguns dias, centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos, a fim de se remover em partículas grosseiras o pequeno precipitado que, às vezes, se formou. O líquido sobrenadante foi empregado como antígeno.

Os soros imunes foram preparados em galos, pela injeção endovenosa de 2,5 cc de líquido alantóide contendo vírus. Logo após, injeção intraperitoneal de 5 cc do mesmo líquido. Depois de 5 dias, repetiu-se a inoculação intraperitoneal de 5 cc, executando-se a sangria passados 15 dias desta última injeção. Deixou-se coagular e separou-se o soro, que foi clarificado pela centrifugação comum.

Para executar a reação de fixação do complemento, empregamos a técnica adotada no Centro Internacional para o estudo da Gripe, cujo ramo, para as Américas, acha-se localizado na cidade de Montgomery, Estado de Alabama, onde um de nós teve ocasião de estagiar. Resultou das diferentes e múltiplas experiências que ali se tem feito, nesse sentido.

Prepara-se, em primeiro lugar, o tampão salino de veronal (TV), de acôrdo com a fórmula abaixo, passando-se, em seguida às diferentes fases da reação.

Tampão de Veronal (TV)

NaCl	83,80 g
NaHCO ₃	5,52 g
Barbital sódico (Na 5,5 — Dietilbarbitato) ..	3,00 g
Barbital (5,5 — Acido dietilbarbitúrico)	4,60 g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	1,00 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,20

1. Dissolver os três últimos ingredientes em cêrca de 500 ml de água distilada aquecida.

2. Dissolver os três primeiros ingredientes em cêrca de 100 ml de água distilada, em frasco volumétrico de 2 litros.

3. Adicionar a solução aquecida (1) ao frasco (2) e juntar água até a marca dos 2 litros.

4. De 200 ml da solução (3), conservada à temperatura do refrigerador, preparar solução isotônica juntando água distilada, até completar 1 litro, em cilindro graduado ou em frasco volumétrico.

5. À solução acima, destinada aos trabalhos, juntar 1 g de soro de boi. Na prática, a sua substituição pela gelatina a 0,02% dá resultados satisfatórios, adicionando-se 100 ml de gelatina Bacto a 0,2%, dissolvida por aquecimento brando, a 200 ml do tampão de veronal, antes de completar 1.000 ml com água distilada.

Pronta a solução, preparar a suspensão de glóbulos vermelhos sensibilizados. Os glóbulos são obtidos de sangue de carneiro, que se recebe em balão com pérolas de vidro para desfibriná-lo. Centrifugar em TV durante 10 minutos a 1.000 rpm e, com o depósito de glóbulos, fazer a suspensão a 2%.

Passamos, depois, à hemolisina, que se usa, na prova, na diluição ótima em 0,1 ml. Prepara-se a diluição a 1:100 e guarda-se a 20°C.

A titulação é feita em suportes de filas de 10 orifícios de um lado e 15 de outro. A reação pode ser feita em placas de matéria plástica ou em tubos.

Colocar 0,1 ml de sôro negativo ou antígeno normal como seja a membrana cório-alantóide (MCA) diluída a 1:5, em 14 tubos.

A cada um dêsses tubos juntar 0,1 ml de TV.

Começar com a diluição a 1:10 do complemento e preparar as diluições em série, conforme o seguinte quadro:

<i>Para obter as diluições</i>	<i>Usar Complemento 1:10</i>	<i>TV</i>
1:30	0,8	1,6
1:40	0,6	1,8
1:50	0,5	2,0
1:60	0,4	2,0
1:70	0,4	2,4
1:80	0,3	2,1
1:90	0,3	2,4
1:100	0,3	2,7
1:110	0,3	3,0
1:120	0,2	2,2
1:130	0,2	2,4
1:140	0,2	2,6
1:150	0,2	2,8
1:160	0,2	3,0

Distribuir 0,2 ml de cada diluição de complemento na série de 10 tubos e preparar outra série contendo cada tubo 0,4 ml de TV sem complemento.

Agitar e colocar a 37°C durante 30 minutos.

Durante êsse tempo, preparar as misturas das diluições variáveis da hemolisina e glóbulos vermelhos a 2%, conforme a seguinte distribuição:

<i>Para obter as diluições da hemolisina</i>	<i>Hemolisina 1:100</i>	<i>TV</i>	<i>Despresar</i>	<i>Glóbulos</i>
1:200	1,0	1,0	—	2,0
1:400	0,5	1,5	—	2,0
1:600	0,3	1,5	—	1,8
1:800	0,3	2,1	—	2,4
1:1000	0,3	1,8	—	2,0
1:1500	0,2	2,8	—	3,0
1:2000	0,2	3,8	2,0	2,0
1:3000	0,2	5,8	4,0	2,0
1:4000	0,2	7,8	6,0	2,0
1:5000	0,2	9,8	8,0	2,0

Acrescentar 0,2 ml de cada combinação de hemolisina e glóbulos à série de tubos contendo as diluições do complemento. É essencial que, antes de adicionar os glóbulos sensibilizados, fiquem os mesmos à temperatura ambiente, pelo menos durante 10 minutos, misturando-se bem antes e depois dêse repouso.

Finalmente, agitar os suportes com os tubos da reação e incubá-los a 37°C durante 30 minutos.

Os resultados da titulação podem ser vistos no Quadro 2. O limite ótimo das diluições da hemolisina está entre 1:600 e 1:1500. A diluição a 1:1200 pode ser usada quando é necessário economizar. A diluição a 1:1500 é considerada marginal e, portanto, menos aconselhável.

As titulações da hemolisina são feitas em cada nova partida deste anticorpo.

QUADRO 2

HEMO- LISINA	DILUIÇÕES DO COMPLEMENTO														
	1:30	1:40	1:50	1:60	1:70	1:80	1:90	1:100	1:110	1:120	1:130	1:140	1:150	1:160	0
1:200.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±	±	1	1	2	4
1:400.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±	1	1	2	4
1:600.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±	1	2	4
1:800.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±	1	1	4
1:1000.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±	1	2	4
1:1500.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±	1	2	4
1:2000.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±	±	1	3	4
1:3000.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±	1	1	2	3	4
1:4000.....	0	0	0	0	0	±	1	1	2	2	3	3	3	4	4
1:5000.....	0	0	0	±	1	1	2	2	3	3	4	4	4	4	4

O complemento fresco ou liofilizado deve ser sempre titulado em presença do antígeno. Quando os antígenos têm propriedades desconhecidas, todos os empregados na reação devem ser incluídos na titulação do complemento. Sòmente depois dessa prova, as titulações podem ser feitas com poucos antígenos representativos. Geralmente empregamos um esquema de titulação com 3 antígenos, conforme referimos.

Avalia-se a atividade do complemento em 4 séries de 13 diluições.

Aos tubos da primeira fila, juntar 0,1 ml do antígeno A, encarado como precomplementar em diluição ótima.

Aos tubos da segunda fila juntar 0,1 ml de antígeno B, que se verificou sem efeito sôbre o complemento, em diluição ótima.

Aos tubos da terceira fila juntar 0,1 ml do antígeno C, ligeiramente anti-complementar, em diluição ótima.

Aos tubos da quarta fila juntar 0,1ml de TV, sem antígeno.

Juntar 0,1 ml de TV a todos os tubos.

Preparar a diluição do complemento a 1:10 e fazer as diluições, conforme o seguinte quadro:

<i>Complemento a 1:10</i>	<i>TV</i>	<i>Diluição final correspondente</i>
0,2	1,0	1:60
0,2	1,2	1:70
0,2	1,4	1:80
0,2	1,6	1:90
0,2	1,8	1:100
0,2	2,0	1:110
0,2	2,2	1:120
0,2	2,4	1:130
0,2	2,6	1:140
0,2	2,8	1:150
0,2	3,0	1:160
0,2	3,2	1:170
0,2	3,4	1:180

Colocar 0,2 ml de cada diluição do complemento nos tubos das 4 séries. Agitar e incubar a 37°C durante 30 minutos.

Colocar 0,2 ml das hemátias sensibilizadas em cada tubo. Para sensibilizar as hemátias juntar 10 minutos antes de terminar o primeiro tempo de incubação, a suspensão de hemátias a 2% a igual volume da diluição de hemolisina em concentração ótima.

Depois de agitar bem, incubar a 37°C durante 30 minutos e fazer a leitura.

Poder-se-á ver, no Quadro 3, uma titulação típica do complemento.

Para acomodar grande grupo de antígenos, a dose conveniente de complemento pode ir de 1 1/2 a 2 unidades. Por exemplo, de acordo com o Quadro 3, a diluição a 1:70 do complemento seria satisfatória para ser usada com todos os antígenos empregados. Esta diluição representa 2 unidades de complemento para o antígeno normal de membrana cório-alantóide e cerca de 1,6 unidade para outro antígeno qualquer, com algum poder anticomplementar.

O antígeno deve ser: a) anticomplementar e, se possível, precomplementar; e b) deve ser o máximo possível específico.

A titulação do antígeno é feita em séries de diluições 1:2 do antígeno contra idênticas diluições do sôro imune, a fim de obter-se a diluição ótima na fixação. Este processo é denominado, pelos autores norte-americanos, "block" ou "box" *titration* e poderá ser visto no Quadro 4.

QUADRO 3
Dosagem complemento

ANTÍGENO EM USO (em ótima diluição)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TV	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Complemento diluído.....	0,2 1/30	0,2 1/40	0,2 1/50	0,2 1/60	0,2 1/70	0,2 1/80	0,2 1/90	0,2 1/100	0,2 1/110	0,2 1/120
Agitar — Banho-Maria 37° — 30'										
Sistema hemolítico.....	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Agitar — Banho-Maria 37° — 30'										

QUADRO 4
Verificação do antígeno — Poder impediente

	1	2	3	4	5	6	7	8
ANTÍGENO (*).....	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	—	—	0,1 puro
TV	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,2	0,3
Complemento 1/10.....	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	0,2	—
Agitar — Banho Maria 37° — 30'								
Sistema hemolítico.....	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

(*) Antígeno inativado no dia da reação.

Para praticar a reação, juntar, nos tubos, 0,1 ml da diluição do antígeno a 0,2 ml do complemento dosado. Agitar e colocar a 4-6°C, até o dia seguinte. Depois de colocar os tubos à temperatura ambiente, durante 10 a 20 minutos, juntar o sistema hemolítico e incubar a 37°C durante 30 minutos.

A diluição ótima do antígeno é definida como a mais alta diluição que provoca a fixação de 3 a 4 + com a mais alta diluição de sôro. Se a fixação termina abruptamente, depois da diluição ótima, devemos usar 2 unidades do antígeno.

Usar diluições a 1:4, em série, do sôro. É conveniente preparar diluições do sôro em suficiente volume para séries réplicas, a fim de obter-se a leitura com antígeno apropriado.

O sôro é inativado a 60°C durante 20 minutos.

Como testemunha, inclui-se um sôro conhecido em cada prova e para cada antígeno.

A reação é praticada de acôrdo com o Quadro 6.

Testemunha do complemento: explicação do resultado da prova em 5 tubos. Os tubos contendo 0,20 e 0,15 de complemento diluído devem revelar hemólise completa. O tubo contendo 0,10 ml deve revelar hemólise completa ou quase. Os tubos contendo 0,05 ml e 0,025 ml não devem revelar hemólise. Se o tubo, contendo 0,05 ml, revelar hemólise é sinal que se usou excesso de complemento. Se os tubos contendo 0,20 ml e 0,15 ml não revelaram hemólise completa, a quantidade de complemento foi insuficiente.

Preparar os padrões para a comparação da seguinte maneira: A hemoglobina para as reações é preparada por congelamento e descongelamento rápidos, por três vezes, da diluição a 1:6 da suspensão de glóbulos a 2%:

<i>Padrões</i>	<i>Negativo</i>	1+	2+	3+	4+
<i>Diluição a 1:6</i>					
<i>dos glóbulos</i>	0	0,15 ml	0,3 ml	0,45 ml	0,6 ml
<i>a 2%</i>	0,6	0,45	0,3	0,15	0

Leitura

4	corresponde	aproximadamente a	0-10%	de hemólise
3	"	"	" 15-35%	" "
2	"	"	" 40-60%	" "
1	"	"	" 65-85%	" "
±	"	"	" 90%	" "
0	"	"	" 100%	" "

INTERPRETAÇÃO DA REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO, SEGUNDO A TÉCNICA DESCRITA

Sorològicamente, consideram-se válidos os resultados se as testemunhas fornecem resultados corretos e o sôro não assinala reação com antígeno normal ou, então, ligeira reação. No caso de observar-se qualquer reação não específica, pratica-se absorção com glóbulos de carneiro, juntando-se 1 ml de sôro a 1 ml de glóbulos obtidos após lavagem e centrifugação. Mistura-se bem e incuba-se durante 30 minutos à temperatura ambiente ou, durante a noite, no refrigerador. Após a absorção, removem-se as células pela centrifugação a 2.000 rpm durante 10 minutos. Tal processo muitas vezes remove a causa de reação não específica.

O significado clínico dos resultados pode ser avaliado segundo os achados clínicos, epidemiológicos e sorològicos. O laboratório ajudará o médico, fornecendo os resultados em têrmos que facilitem como "tal reação pode corresponder a uma infecção por tal agente" ou "pode cor-

QUADRO 5

Verificação do poder fixador do antígeno testemunha

	1	2	3	4	5		6	7	8	9
Antígeno.....	0,1 Puro	0,1 1/2	0,1 1/4	0,1 1/4	0,1 1/16	— —	0,1 Puro	0,1 Puro	0,1 Puro	—
Sêro positivo.....	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	Soro neg.	0,1	0,1 sol. TV	0,3 sol. TV	0,2 sol. TV
Complemento dosado (*)....	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2		0,2	0,2	—	0,2
Agitar — Banho-Maria 37°C — 30'										
Sistema hemolítico.....	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2		0,2	0,2	0,2	0,2

NOTA — O sêro positivo deve ser também usado nas diluições de 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64.

(*) Complemento dosado no dia da reação. Usar 1/2 a 2 unidades (ótimo diluído de 1/60 a 1/100). Verificado por esta titulação, o ótimo de diluição do antígeno em relação ao seu poder fixador, esta diluição passa a ser usada na reação.

responder a uma infecção por tal agente, em tempo indeterminado” ou, ainda, “resultado não significativo”. Um aumento de 4 vezes, ou mais, num título, em testes comparativos feitos na fase aguda ou de convalescença, pode encarar-se como significativo de infecção passada. No entanto, toda reação ou todo tipo de alteração sorológica se deve considerar individualmente para cada vírus ou para cada virose, pois, cada qual, varia conforme o tempo em que aparecem os anticorpos, o período de título máximo e o de persistência dos anticorpos, frequência das reações anamnéticas, e a sensibilidade da produção de anticorpos em relação à terapêutica pelos antibióticos. As interpretações são complicadas, quando se fazem os testes com uma só amostra ou, então, com amostras retiradas muito tempo após o início (depois da formação de anticorpos). É desaconselhável fazer tais provas. Em qualquer circunstância, merecem especial atenção os seguintes fatores, quando se visa o diagnóstico, empregando-se o sêro humano: 1. As ligações sorológicas com dado vírus (tempo de aparecimento de anticorpos, título máximo, etc.). 2. Tempo de colheita da amostra. 3. Tratamento por antibióticos (no caso de rickettsioses e do grupo psitacose-linfogranuloma venéreo). 4. História de vacinação anterior. 5. História de viagens. 6. Residência do paciente. 7. Ocupação. 8. Presença de outros vírus ou rickettsias com componentes antigênicos comuns.

Tomando por base a descrição que acabamos de fazer, iniciamos as verificações e titulações dos diferentes elementos que tomam parte na reação, até a sua execução final. A hemolisina foi titulada conforme se vê no Quadro 2; a dosagem do complemento, no Quadro 3; a verificação dos poderes impediante e fixador do antígeno, nos Quadros 4 e 5. Finalmente, no Quadro 6, representamos a maneira como foi executada a reação e no Quadro 7, a verificação concomitante dos seus componentes, testemunha do seu exato comportamento.

QUADRO 6**Quadro da reação**

	1	2	3	4	5	6	7
Sôro em exame.....	0,1 Puro	0,1 1/2	0,1 1/4	0,1 1/8	0,1 1/16	0,1 1/32	1 1/64
Antígeno dosado.....	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Agitar							
Complemento dosado 11/2 a 2 unidades.....	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Geladeira 18 a 20 horas — 4 a 6°C depois 10 a 20 minutos em temperatura ambiente							
Sistema hemolítico.....	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Agitar — Banho-Maria 37°C — 30' — Leitura.							

Na leitura dos resultados levar em conta que a diluição final do sôro é 4 vezes a inicial.

QUADRO 7**Quadro das testemunhas de elementos da reação**

	Test. complemento					Sistema hemolítico	Test. das hemátias
	1	2	3	4	5		
TV	0,1	0,15	0,20	0,25	0,275	0,20	0,4
Antígeno dosado.....	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—
Agitar							
Complemento dosado.....	0,20	0,15	0,10	0,05	0,025	0,2	—
Geladeira até o dia seguinte 4 a 6°C							
Sistema hemolítico.....	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Para cada antígeno deve ser feita uma testemunha, incluindo-se uma série com líquido alantóide normal.

QUADRO 8**Imunesoros preparados com amostras padrões**

Antígeno Tipo Amostra	A-PR8	A-Weiss	A1-FMI	A2-Japão	B-Lee
A — PR8.....	1:16	1:4	1:4	1:4	0
A — Weiss.....	0	1:16	1:4	0	0
A1 — FMI.....	1:4	0	1:16	1:4	0
A2 — Japão.....	0	1:4	1:4	1:32	0
B — Lee.....	0	0	0	0	1:32
Testemunha					
Líquido alantóide.....	0	0	0	0	0

QUADRO 9**Imunesoros preparados com as amostras isoladas**

NÚMEROS	13	14	15	19	24	32	34	43	44	45	51	58	66	76	78	80	84
Antígeno Tipo Amostra																	
A — PR8.....	1:4	1:4	1:4	1:8	1:4	1:8	1:4	1:16	1:4	0	1:8	1:8	1:4	0	1:4	1:4	1:4
A — Weiss.....	1:4	1:4	0	0	0	1:4	0	1:4	0	0	1:4	1:8	0	0	1:4	1:4	1:4
A1 — FMI.....	0	1:4	0	0	1:4	1:4	0	1:8	1:4	0	1:8	1:8	1:4	0	1:4	1:4	1:4
A2 — Japão.....	1:32	1:32	1:32	1:8	1:64	1:64	1:64	1:128	1:32	1:32	1:64	1:64	1:64	1:32	1:64	1:64	1:32
B — Lee.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Testemunha																	
Líquido alantóide, nor- mal.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

RESULTADOS

Iniciamos as nossas pesquisas, tendentes a conhecer melhor as propriedades antigênicas das amostras que isolamos no decorrer da epidemia de gripe asiática, pelo preparo de imunesoros padrões empregando as amostras clássicas de cada tipo ou variante. Em seguida, verificamos o comportamento desses soros em relação àquelas amostras, pela reação de fixação do complemento, que é a única que nos ocupa no momento. Os resultados vão expressos no Quadro 8, não restando dúvidas, quer quanto à pureza das amostras, quer quanto à atividade do imunesoro e sua especificidade. A reação de fixação do complemento serve para separar os tipos, menos as variantes, o que não acontece com a de inibição de hemaglutinação, que as identifica. Apesar disso, como se pode ver no Quadro, há uma diferença na intensidade da fixação, sempre mais acentuada para as amostras que serviram para o preparo do soro específico.

Passando ao estudo das amostras isoladas, nossa principal finalidade, obtivemos resultados inteiramente concordantes, no que diz respeito às provas de hemaglutinação anteriormente praticadas, assim

como pudemos confirmar as ligações de grupo entre estas amostras, provenientes dos mais afastados pontos do país, tôdas da variante A2, com as pertencentes às variantes A e A1. As reações foram sempre negativas com amostra do tipo B. Os soros foram preparados com 17 amostras, as que melhor proliferaram em embrião de galinha, dentre as 43 que isolamos. Os resultados da reação de fixação do complemento podem ser vistos no Quadro 9. Quando se empregou antígeno preparado com a variante A2, as reações foram sempre muito mais acentuadas, de 8 a 16 vêzes, se compararmos com as variantes A e A1. Em alguns casos, chegou mesmo a ser negativa a reação com êsses antígenos, do mesmo tipo mas de variante diferente. Os nossos resultados confirmam, não só a perfeita individualidade da variante A2, como o diagnóstico das amostras isoladas, tôdas a ela pertencentes.

RESUMO E CONCLUSÕES

Dada a importância da reação de fixação do complemento no estudo do vírus da gripe, resolvemos aplicá-la ao exame de inúmeras amostras que isolamos no decurso da epidemia de gripe asiática, ocorrida em 1957, no Brasil. As referidas amostras já haviam sido estudadas pela prova de hemaglutinação, que serviu para diagnosticá-las. Sabemos que, pela reação de fixação do complemento, se define o tipo de qualquer amostra, não a variante, isto é, os antígenos A, A1 e A2 fixam o complemento, indiferentemente, em presença de anticorpos A, A1 e A2. Não o fazem com o tipo B, C ou D. Tal separação só é possível com a prova de hemaglutinação, que havíamos anteriormente praticado. Visamos, no presente trabalho, por meio daquela reação, estabelecer as relações entre os antígenos de amostras padrões com soros por nós preparados, pela inoculação das amostras que isolamos, ao lado dos soros preparados com as amostras padrões. Foram empregadas as variantes do tipo A e o tipo B. O antígeno foi preparado com o líquido cório-alantóide contendo razoável taxa de hemaglutininas para cada amostra do vírus. Os imunesoros foram preparados em galos, pela injeção do líquido alantóide contendo vírus. A técnica empregada na reação foi a do Centro Internacional de Estudo da Gripe, ramo das Américas, localizado em Montgomery.

Verificamos, pelos resultados obtidos, assinalados nos Quadros 8 e 9, que separamos nitidamente o tipo A do B, mas não as variantes do tipo A, em sentido absoluto, uma vez que qualquer dos seus antígenos, A, A1 ou A2, apresentou a reação positiva se bem que houvesse diferença, às vêzes bastante acentuada, na intensidade da reação. Sempre que se usou o antígeno da variante A2 a reação foi 8 a 16 vêzes mais forte, em comparação com os antígenos das variantes A e A1. Em raros casos, a reação foi negativa com êstes antígenos. Verificamos, portanto, a perfeita individualidade da variante A2, para isso trabalhando com 17 das 43 amostras que isolamos no decorrer da última pandemia de gripe.

SUMMARY

The complement fixation test in the study of the A2 influenza virus

The authors studied, by the complement fixation test, the A2 influenza virus strains isolated from various Brazilian localities, during the 1957 epidemic. They prepared immunesera in roosters by the inoculation of the infected allantoic fluid with each of the 17 isolated strains, in comparison with immunesera prepared with the PR8, Weiss, FM1, Japan and Lee strains. The tests were positive with the A group of antigens and negative with the B type, Lee strain. The tests performed with the A2 virus antigen fixed complement to a titer 8 to 16 times higher than the A and A1 virus antigens. The behavior of those 17 strains and the Japan strain was the same.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HOYLE, L. & FAIRBROTHER, R. W., 1937, Further studies on complement-fixation in influenza: Antigen production in egg-membrane culture and the occurrence of a zone phenomenon. *Brit. J. Exp. Path.*, 18: 425.
- LACORTE, J. G., MONTEIRO, E. & LOURES, J. C., 1957, Isolamento do vírus A-Ásia-57, no Rio de Janeiro. *Hospital*, 52: 369.
- LACORTE, J. G., MONTEIRO, E. & LOURES, J. C., 1958, O isolamento do vírus da gripe asiática de material proveniente de algumas localidades do Brasil. *Rev. Brasil Med.*, 16: 455.
- NIGG, C., CROWLEY, J. H. & WILSON, D. E., 1941, The use of chick embryo tissues and fluid as antigens in the complement fixation reaction in influenza. *J. Immunol.*, 42: 51.
- SMITH, W., 1936, The complement fixation reaction in influenza. *Lancet*, 2: 1256.