

EMPREGO DE REAÇÃO IMUNO-ENZIMÁTICA NA DETERMINAÇÃO DO CARÁTER GENÉTICO DE AMOSTRAS DE POLIOVÍRUS

HERMANN G. SCHATZMAYR & MITIKO FUJITA

Uma reação imuno-enzimática em microplacas foi utilizada para a diferenciação do caráter genético de amostras de poliovírus, em relação às amostras padrões atenuadas de Sabin tipos 1, 2 e 3 e às amostras virulentas Mahoney, MEF-1 e Saukett, utilizando soros policlonais mono-específicos, preparados por absorção com as amostras heterólogas de cada tipo. Em 74 das 79 amostras de vírus examinadas (93,6%) foi possível identificar o seu caráter como amostras selvagens ou vacinais. A utilização da prova imuno-enzimática aplicada aos vírus da poliomielite é discutida.

A diferenciação do caráter genético de virulência ou não de amostras de poliovírus isoladas na natureza, constitui um problema importante, pela impossibilidade de se inocular em primatas todas as amostras a serem estudadas, sendo necessário utilizar outros métodos laboratoriais para esta análise.

Estes métodos procuram relacionar o comportamento das amostras padrões, com aquele das amostras em análise, em diversos sistemas. Observou-se uma evolução constante desde as descrições iniciais do crescimento em diferentes temperaturas de incubação, metodologia ainda hoje utilizada no controle das vacinas vivas contra a poliomielite, até os modernos métodos de análise do genoma viral (finger-print), o emprego de anticorpos monoclonais e soros absorvidos (van Wezel & Hazendonk, 1979; Minor & Schild, 1981; Minor, Kew & Schild, 1982; Minor, 1982; Crainic et al., 1983). Por outro lado, as reações imuno-enzimáticas, por sua alta sensibilidade e rapidez de execução, encontram no campo das enteroviroses uma notável aplicação (Herrmann, Hendry & Collins, 1979; Souvras et al., 1980; Hagenars et al., 1983).

Uma prova imuno-enzimática, utilizando soros absorvidos específicos, foi por nós padronizada e utilizada no estudo de amostras de poliovírus isoladas no país nos últimos três anos, pelos Laboratórios da Rede Nacional de Saúde Pública encarregados do diagnóstico laboratorial de poliomielite no país.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizamos como anticorpos de captura, soros imunes policlonais, obtidos em bovinos, por inoculação de amostras padrões purificadas de poliovírus.

Os antígenos virais, tanto as amostras padrões como aquelas em análise, previamente tipificadas, foram preparadas em culturas de células Vero (Davis & Philippotts, 1974) crescendo com meio Eagle MEM, suplementado com soro fetal bovino antes da inoculação de vírus, segundo técnicas padrões. Estes antígenos continham no mínimo $10^{7,5}$ TCD₅₀/ml e não necessitaram purificação posterior.

Utilizaram-se para a reação placas de poliestireno flexíveis e descartáveis colocando-se o soro de captura por uma noite e acrescentando-se os antígenos e os demais reagentes, essencialmente segundo técnicas descritas (Voller, Bidwell & Bartlett, 1976; Voller, Bartlett & Bidwell, 1978; Pereira et al., 1983) e resumidas a seguir:

- 1 — Soro de captura bovino, anti-poliomielite, tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,7, por uma noite a 4°C — 100µl por cavidade.
- 2 — Antígeno viral, 2 horas a 37°C — 100µl por cavidade.
- 3 — Antígeno específico, tipos 1, 2 e 3 monoabsorvidos, 2 horas a 37°C — 100µl por cavidade (soro de coelho).
- 4 — Anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (IgG de suíno) 2 horas a 37°C — 100µl por cavidade.
- 5 — Substrato OPD cerca de 10 minutos — 20µl por cavidade.
- 6 — Reação bloqueada com solução de ácido sulfúrico 2M — 1 gota.
- 7 — Leitura em espectrofotômetro especial para micro placas.

Para as lavagens sucessivas e as diluições dos reagentes, exceto o soro de captura, utilizou-se 200µl PSB, pH 7,2 com Tween 20, na diluição final de 1/500; na diluição dos soros de captura não se utilizou o Tween 20.

Como soros monoabsorvidos usaram-se soros policlonais preparados em coelhos através duas inoculações intravenosas de cerca de 10^{10} TCD₅₀ de poliovírus purificados. Estes soros foram absorvidos com as amostras heterólogas do mesmo tipo sorológico, incubando-se o soro com vírus concentrado e eliminando-se as partículas residuais por ultracentrifugação e aquecimento a 56°C por 30 minutos, como descrito por van Wezel & Hazendonk, 1979.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Examinamos um total de 79 amostras de poliovírus dos três tipos sorológicos obtidos de diversos laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública e enviadas ao nosso Centro de Referência para análise do seu caráter genético.

Estas amostras foram obtidas principalmente de vacinados com vacina oral sendo os dados obtidos na caracterização das amostras apresentados na Tabela I.

TABELA I

Caracterização de amostras de poliovírus por reação imuno-enzimática

Amostras	Totais	Caráter vacinal	Caráter selvagem	Indeterminado
Poliovírus tipo 1	32	6	24	2
Poliovírus tipo 2	22	17	3	2
Poliovírus tipo 3	25	9	15	1
Totais	79	32	42	5

A análise dos resultados nos mostra que o sistema utilizado foi capaz de identificar, com clareza e reprodutibilidade, o caráter genético de 74 das 79 amostras examinadas (93,6%) o que constitui um resultado excelente, considerando a rapidez de execução da prova e a dispensa da utilização da cultura de tecidos; para se estabelecer o sistema como descrito depende-se, porém, de soros absorvidos específicos cujo preparo é complexo embora sejam utilizados nesta reação em quantidades reduzidas.

Anticorpos monoclonais para os três tipos de poliovírus, preparados com as amostras padrões virulentas e não virulentas como já descritas por diversos autores (Ferguson et al., 1982; Couillin et al., 1982; Crainic et al., 1983) poderão igualmente ser utilizados no sistema proposto em lugar dos soros monoabsorvidos substituindo-se ainda no conjugado acima utilizando o soro antiovelho e mantendo-se os demais elementos.

A microrreação imuno-enzimática acima descrita pode ainda ser utilizada para tipificação de poliovírus, eliminando-se uma inoculação em cultura de tecidos e abreviando-se em cerca de cinco dias o tempo de identificação; assinala-se que a técnica utilizada é capaz de demonstrar a presença de mais de uma amostra de poliovírus na mesma suspensão fecal. Observamos este fato em duas das suspensões recebidas, uma delas proveniente de um recém-vacinado o qual excretou os tipos 2 e 3, ambos com caráter vacinal e uma outra na qual encontramos a excreção de poliovírus dos tipos 1 e 3 um deles com caráter vacinal e outro com caráter selvagem. A presença de mais de uma amostra de poliovírus na mesma suspensão fecal representa uma dificuldade ponderável nos métodos clássicos de identificação em cultura de tecidos.

As cinco amostras não caracterizadas devem corresponder a variantes intermediárias ou de transição entre o caráter vacinal e não vacinal e que apresentam sítios de reação (epítomos) comuns aos soros vacinais e selvagens, como observado por outros autores (Kapsenberg et al., 1981; Crainic et al., 1983).

A técnica descrita poderá ser utilizada para estudos epidemiológicos na caracterização de poliovírus isolados de infecções naturais, de vacinados e do meio ambiente.

SUMMARY

Characterization of poliovirus strains by an enzyme immunoassay (EIA).

An enzyme immunoassay performed with polyclonal antisera to poliovirus types 1, 2 and 3 absorbed with heterologous strains of the same types was used for the characterization of poliovirus field isolates. The assay allowed the identification of 74 (93.6%) out of 79 isolates as wild or vaccine-like strains.

Applications of EIA for the study of polioviruses are discussed.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. A. van Wezel do Instituto Real de Saúde Pública, Holanda, o interesse no trabalho e o fornecimento de reagentes, bem como ao Dr. Jorge Bermudez, da Divisão Nacional de Laboratórios de Saúde Pública e aos demais colegas da Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. À Organização Mundial de Saúde, que proporcionou viagem de treinamento a um dos autores (H.G.S.) ao Centro Internacional de Bilthoven/Holanda.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COUILLIN, P.; CRAINIC, R.; CABAU, N.; HORODNICEANU, F. & BOUE, A., 1982. Strain-specific type 1 poliovirus-neutralizing monoclonal antibodies, *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, 133 :315-323.

- CRAINIC, R.; CONILLIN, P.; BLOUDEL, B.; CABAU, N.; BOUE, A. & HORODNICEANU, F., 1983. Natural variation of Poliovirus neutralization epitopes. *Infection and Immunity* 41 (3) :1217-1225.
- DAVIS, M.P. & PHILLPOTTS, R.J., 1974. Susceptibility of the Vero line of African monkey kidney cells to human enteroviruses. *J. Hyg.* 72 :23-30.
- FERGUSON, M.; MINOR, P.D.; SPITZ, M.; QI YI-HUA; MAGRATH, D.I. & SCHILD, G.C., 1982. Monoclonal antibodies specific for the Sabin vaccine strain of Poliovirus 3. *Lancet*, July, 7 :122-124.
- HAGENAARS, A.M.; VAN DELFT, R.W.; NAGEL, J.; VAN STEENIS, G. & VAN WEZEL, A.L., 1983. A modified ELISA technique for the titration of antibodies to poliovirus as an alternative to a virus neutralization test. *J. Virol. Methods*, 6 :233-240.
- HERRMANN, J.E.; HENDRY, R.M. & COLLINS, M.F., 1979. Factors involved in enzyme-linked immunoassay of viruses and evaluation of the method for identification of enteroviruses. *Journ. of Clin. Microbiol.* 10 (2) :210-217.
- KAPSENBERG, J.G.; COUTINHO, R.A.; HAZENDONK, A.G.; RAN, A.B.R. & VAN WEZEL, A.L., 1981. Epidemiological implications of the isolations and intratypic serodifferentiation of Poliovirus strains in the Netherlands. *Develop. biol. standard.* 47 :293-301.
- MINOR, P.D., 1982. Characterization of strains of type 3 poliovirus by oligonucleotide mapping. *J. Gen. Virol.*, 59 :307-317.
- MINOR, P.D. & SCHILD, G.C., 1981. Identification of the origin of Poliovirus isolates. Report of a World Health Organization informal meeting, 1979-80. *Lancet*, Outubro, 31 :968-970.
- MINOR, P.D.; KEW, O. & SCHILD, S.G., 1982. Poliomyelitis epidemiology, molecular biology and immunology. *Nature* 299 :109-110.
- PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; BARTH, O.M.; SUTMOLLER, F.; FARIAS, V. & VIDAL, M.N.P., 1983. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immunoelectron-microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infections in children. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 78 (4) :483-490.
- SOUVRAS, M.; MONTAGNON, B.; FANGET, B.; VAN WEZEL, A.L. & HAZENDONK, A.G., 1980. Direct enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of poliomyelitis virus D-Antigen. *Develop. biol. Standard* 46 :197-202.
- VOLLER, A.; BARTLETT, A. & BIDWELL, D.E., 1978. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Path.* 31 (6) :507-520.
- VOLLER, A.; BIDWELL, D.E. & BARTLETT, A., 1976. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 53 :55-65.
- VAN WEZEL, A.L. & HAZENDONK, A.G., 1979. Intratypic serodifferentiation of poliomyelitis virus strains by strain-specific antisera. *Intervirol.* 11 :2-8.