

## 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

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

RSPU-B/261

STEWIEN, K. E. & LACERDA, J. P. G. de — *Aplicação do método de 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.

**RESUMO:** Foram estudadas culturas primárias de células renais de macaco rhesus (RMK) e culturas de células contínuas Hep-2, comparativamente em provas de identificação sorológica intratípica de 28 estirpes de poliovírus dos tipos 1 e 3, pelo método da "comparação dos índices de neutralização". A correlação entre os índices foi elevada -0,953 e 0,986 após incubação de três e cinco dias, respectivamente, e todas as estirpes examinadas mostraram o mesmo resultado de identificação nos dois sistemas celulares estudados. Disto se conclui que as culturas de células Hep-2 podem ser utilizadas como alternativa às culturas primárias de rim de macaco rhesus, na identificação intratípica de poliovírus dos tipos 1 e 3, pelo método mencionado, com as vantagens inerentes às linhagens de células contínuas.

**UNITERMOS:** Poliovírus. Índices de neutralização. Cultura de células.

### INTRODUÇÃO

A vigilância da poliomielite nos países em que se mantém a vacinação de Sabin, de vírus vivos atenuados, obriga, naturalmente, realizar inquéritos sorológicos que mostram, periodicamente, o estado imunitário da população, e estabelecer um esquema de detecção de vírus<sup>2, 5, 9, 15</sup>. É preciso, por um lado, verificar se os poliovírus eliminados pelos grupos vacinados continuam mostrando as mesmas propriedades dos vírus atenuados da vacina

oral e, por outro lado, determinar a extensão da circulação dos poliovírus naturais ainda existentes nas comunidades vacinadas ou, então, comprovar a sua total eliminação. Para tanto, precisa o laboratório de virologia, inicialmente, isolar e identificar os vírus de amostras fecais de crianças e, também, da rede de esgotos, para então poder, através dos marcadores genéticos, diferenciar os poliovírus naturais dos vacinais.

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

\*\* Chefe da Seção de Vírus Respiratórios e Entéricos do Instituto Adolfo Lutz — Av. Dr. Arnaldo, 355 — São Paulo, SP — Brasil

Para este propósito, ocupa o *marcador* antigênico uma posição especial entre os diversos *marcadores* genéticos conhecidos, pois revela semelhanças e diferenças antigênicas das estirpes de poliovírus pertencentes a um mesmo tipo imunológico<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 16</sup>. A diferenciação sorológica intratípica de poliovírus conta, atualmente, com um método relativamente simples e econômico, que preenche os requisitos necessários às investigações em que numerosas estirpes de vírus são examinadas<sup>12, 22, 13</sup>. Trata-se do método da “comparação dos índices de neutralização” que, entretanto, assim como os demais métodos utiliza culturas primárias de células renais de macaco rhesus. A fim de possibilitar o uso deste vantajoso método em nosso meio, que não pode dispor destas culturas, pois a sua importação é problemática e altamente dispendiosa, estudou-se, de modo comparativo, a viabilidade do método da “comparação dos índices de neutralização”, quando se utiliza culturas de células da linhagem Hep-2 que podem ser mantidas no laboratório de forma rotineira.

#### MATERIAL E METODOS

*Vírus* — Foram examinadas 28 estirpes de poliovírus pertencentes aos tipos 1 e 3, isolados de casos de paralisia não associados à vacinação oral (seis destes casos haviam recebido, no passado, uma, duas ou três doses de vacina oral trivalente). Serviram de controles, para as provas de identificação sorológica intratípica, as estirpes atenuadas LSc 2ab e Leon 12a,b, respectivamente, dos tipos 1 e 3 de vacina oral de Sabin, gentilmente cedidas pelo Instituto Butantan, e os protótipos Mahoney (tipo 1) e Saukett (tipo 3).

*Soros imunes* — Os soros anti-Sabin 1 e 3 foram preparados em coelhos, recebendo cada animal 3 doses semanais de uma mistura de 1,0 ml de vírus e 1,0

ml de adjuvante de Freund (Arlacel + Bayol), seguidas de uma dose endovenosa de 2,0 ml da suspensão de vírus, na quarta semana. As suspensões de vírus eram previamente purificadas, por meio de tratamento com o fluoreto de tricloro-etano (Freon, Du Pont). Os soros assim preparados mostraram um título neutralizante contra as estirpes homólogas de pelo menos 1:640.

*Identificação sorológica intratípica* — A técnica utilizada foi descrita em detalhe anteriormente por Smit & Wilterdink<sup>11</sup> (1966) e Stewien<sup>13</sup> (1971). As misturas de vírus-soro, assim como os controles de vírus, eram preparados em quantidades duas vezes maiores às anteriormente indicadas, pois foram inoculados dois sistemas de células em todas as experiências conduzidas: RMK e Hep-2. O critério de identificação adotado foi o mesmo dos trabalhos anteriormente citados, ou seja, o critério de Plotkin e col.<sup>10</sup>.

*Culturas de células* — As culturas primárias de rim de macaco rhesus (RMK) foram fornecidas pela Flow Laboratories, Rockville, Md. EUA, através da Organização Pan Americana da Saúde. As culturas de células de Hep-2, utilizadas nas experiências, foram preparadas em nosso laboratório, onde são mantidas de modo rotineiro. Usou-se o meio de Eagle MEM, a base de solução salina balanceada de Earle, adicionado de 10% de soro de vitelo para o meio de crescimento e de 2% do mesmo soro para o meio de manutenção. Todos os meios continham 200 unidades de penicilina e 200 microgramas de estreptomomicina, por mililitro de meio.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 1 e 2 mostram, respectivamente, os resultados de identificação sorológica intratípica das estirpes dos tipos 1 e 3, obtidas com as culturas de células da linhagem Hep-2, comparados com os

TABELA 1  
 Resultados da identificação sorológica intratípica de poliovírus do tipo 1, segundo o método da "comparação dos índices de neutralização", utilizando culturas primárias de rim de macaco rhesus e células Hep-2

Estirpes	72 horas de incubação						120 horas de incubação						Identificação intratípica	
	RMK			Hep-2			RMK			Hep-2			RMK	Hep-2
	s/soro	c/soro	IN	s/soro	c/soro	IN	s/soro	c/soro	IN	s/soro	c/soro	IN		
													Titulo	Titulo
LSc 2ab	4,75	1,75	3,00	4,50	1,50	3,00	5,25	2,25	3,00	5,25	2,25	3,00	-	-
Mahoney	5,50	4,75	0,75	5,50	4,75	0,75	6,25	5,50	0,75	6,25	5,50	0,75	+	+
AL — 680/71	7,00	5,50	1,50	6,75	5,50	1,25	7,50	6,00	1,50	7,25	5,75	1,50	+	+
AL — 681/71	7,25	5,75	1,50	6,75	5,25	1,50	7,25	6,25	1,00	6,75	5,50	1,25	+	+
AL — 682/71	6,75	5,50	1,25	6,50	5,25	1,25	7,25	5,75	1,50	7,25	5,75	1,00	+	+
AL — 684/71	6,75	6,25	0,50	6,50	5,75	0,75	6,75	6,25	0,50	6,75	6,25	0,50	+	+
AL — 701/71	6,50	5,75	0,75	6,25	5,50	0,75	7,25	6,25	1,00	7,25	6,25	1,00	+	+
AL — 702/71	6,50	5,75	0,75	6,25	5,50	0,75	7,25	6,50	0,75	7,25	6,75	0,75	+	+
AL — 703/71	6,75	6,25	0,50	6,50	5,75	0,75	7,50	6,75	0,75	7,15	6,50	0,75	+	+
AL — 704/71	7,25	6,50	0,75	6,75	6,25	0,50	7,50	6,75	0,75	7,50	6,75	0,75	+	+
AL — 706/71	5,50	4,00	1,50	5,25	3,75	1,50	5,75	4,25	1,50	5,50	4,25	1,25	+	+
AL — 723/71	5,75	5,00	0,75	5,50	4,75	0,75	6,25	5,75	0,50	5,75	5,25	0,50	+	+
AL — 724/71	6,00	5,75	0,25	5,50	5,25	0,25	6,00	5,72	0,25	5,75	5,50	0,25	+	+
AL — 726/71	6,50	6,25	0,25	6,25	5,75	0,50	6,50	6,25	0,25	6,50	6,25	0,25	+	+
AL — 745/71	6,75	5,50	1,25	6,25	4,75	1,50	7,25	5,75	1,50	6,75	5,25	1,50	+	+
AL — 746/71	6,50	5,50	1,00	5,75	4,75	1,00	6,50	5,75	0,75	6,50	5,75	0,75	+	+
AL — 747/71	6,50	5,75	0,75	6,50	5,75	0,75	7,25	6,75	0,50	7,25	6,75	0,50	+	+
AL — 748/71	6,25	5,50	0,75	5,50	4,75	0,75	6,50	5,50	1,00	6,25	5,25	1,00	+	+
AL — 749/71	5,75	5,50	0,25	5,25	4,75	0,50	6,25	5,75	0,50	5,75	5,25	0,50	+	+
AL — 750/71	5,50	4,75	0,75	4,25	4,25	0,50	6,00	5,50	0,50	5,50	4,75	0,75	+	+

TABELA 2

Resultados da identificação sorológica intratípica de poliovírus do tipo 3, segundo o método da "comparação dos índices de neutralização", utilizando culturas primárias de rim de macaco rhesus e células Hep-2

Estirpes	72 horas de incubação						120 horas de incubação						Identificação intratípica					
	RMK			Hep-2			RMK			Hep-2					RMK	Hep-2		
	Título s/soro	c/soro	IN	Título s/soro	c/soro	IN	Título s/soro	c/soro	IN	Título s/soro	c/soro	IN	Título s/soro	c/soro			IN	
Leon 12a/b	5,00	1,25	3,75	4,75	1,00	3,75	5,50	1,75	3,75	3,75	5,50	1,75	3,75	5,50	1,75	3,75	-	-
Saukett	5,50	4,00	1,50	5,50	4,00	1,50	6,00	4,50	1,50	1,50	6,00	4,50	1,50	5,75	4,25	1,50	+	+
AL -- 34A/72	3,75	1,75	2,00	3,25	1,25	2,00	4,50	2,50	2,00	2,00	4,25	2,25	2,00	4,25	2,25	2,00	+	+
AL -- 34B/72	3,25	1,00	2,25	3,25	1,25	2,00	4,25	2,25	2,00	2,00	4,25	2,25	2,00	4,25	2,25	2,00	+	+
AL -- 36A/72	3,00	1,25	1,75	3,00	1,50	1,50	3,50	1,75	1,75	1,75	3,50	1,75	1,75	3,50	1,75	1,75	+	+
AL -- 36B/72	3,25	1,50	1,75	3,25	1,50	1,75	3,50	1,50	2,00	2,00	3,50	1,50	1,75	3,50	1,75	1,75	+	+
AL -- 294/72	4,50	2,50	2,00	4,25	2,25	2,00	5,25	3,00	2,25	2,25	4,75	2,75	2,00	4,75	2,75	2,00	+	+
AL -- 322/72	3,25	1,75	1,50	3,25	2,00	1,25	4,25	2,75	1,50	1,50	4,25	2,75	1,50	3,75	2,25	1,50	+	+
AL -- 545A/73	4,75	4,25	0,50	4,50	4,25	0,25	5,50	5,25	0,25	0,25	5,25	4,75	0,50	5,25	4,75	0,50	+	+
AL -- 545A/73	5,75	5,25	0,50	5,50	5,00	0,50	6,50	6,00	0,50	0,50	6,25	5,75	0,50	6,25	5,75	0,50	+	+
AL -- 880/73	4,00	3,25	0,75	3,75	2,75	1,00	4,75	3,75	1,00	1,00	4,75	3,75	1,00	4,50	3,50	1,00	+	+
AL -- 39/74	4,50	2,50	2,00	4,50	2,50	2,00	5,25	3,00	2,25	2,25	4,75	2,75	2,00	4,75	2,75	2,00	+	+

IN: Índice de neutralização (expresso em log.)

das culturas de rim de macaco rhesus (RMK). Verifica-se que os índices de neutralização (IN) das estirpes de referência dos tipos 1 e 3 apresentaram os mesmos valores nos dois sistemas celulares estudados. Segundo o critério de identificação adotado, as estirpes do tipo 1 apresentando:

- a)  $IN \geq 3.0-1/3 (3.0-0.75) = 2.25 \rightarrow$   
 $\rightarrow$  estirpe isóloga à vacinal (-);
- b)  $IN \leq 3.0-2/3 (3.0-0.75) = 1.50 \rightarrow$   
 $\rightarrow$  estirpe heteróloga à vacinal (+);
- c)  $2.25 > IN > 1.50 \rightarrow$  intermediária ( $\pm$ ).

Nota-se que todas as 18 estirpes examinadas foram identificadas, em ambos os sistemas de células, como estirpes heterólogas à vacinal. Este resultado era de se esperar, pois as mesmas são procedentes de casos clínicos não associados à vacinação de Sabin. Houve, assim, concordância total nos resultados de identificação das estirpes do tipo 1, independentemente do período de incubação.

Segundo o mesmo critério, as estirpes do tipo 3 apresentando:

- a)  $IN \geq 3.75-1/3 (3.75-1.50) = 3.00$   
 $\rightarrow$  estirpe isóloga à vacinal (-);

- b)  $IN \leq 3.75-2/3 (3.0-0.75) = 1.50$   
 $\rightarrow$  estirpe heteróloga à vac. (+);

- c)  $2.25 > IN > 1.50 \rightarrow$  intermediária ( $\pm$ ).

Verifica-se que as estirpes do tipo 3 forneceram resultado análogo ao observado com as estirpes do tipo 1, em ambos os sistemas celulares estudados, ou seja, concordância total nos resultados de identificação.

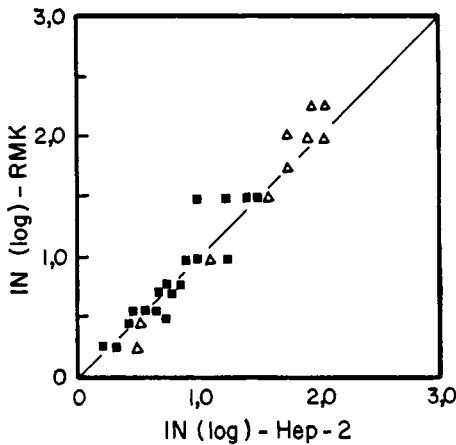
A Tabela 3 mostra a concordância entre os índices de neutralização observados nas culturas RMK e Hep-2. Verifica-se que a maioria dos índices de neutralização coincidiu nos dois sistemas celulares, diferindo os demais, exceto um, em 0,25 log. Nota-se, também, um aumento na percentagem de concordância de 56%, após 72 h, para 71,4%, após 120 h. Com isto, observa-se uma tendência no sentido de uma concordância maior entre os índices, nos dois sistemas, com o aumento do período de incubação. A correlação entre os índices também aumentou de 0,953 para 0,986. Deve-se, pois, dar preferência a um período de incubação de 120 horas (5 dias) para a leitura final das provas de identificação. Após este período não foram mais verificadas alte-

TABELA 3

Concordância entre os índices de neutralização (IN) nas culturas de rim de macaco rhesus e células Hep-2

Concordância entre os IN nos 2 sistemas celulares	72 horas de incubação		120 horas de incubação	
	n.º de estirpes	de concordância	n.º de estirpes	de concordância
Índices iguais	15	53,6	20	71,4
Diferença de 0,25 log	13	46,4	7	25,0
Diferença de 0,50 log	0	(0,0)	1	(3,6)
Total	28	100,0	28	100,0

rações nos índices de neutralização em nossas experiências. A Figura 1 mostra a distribuição dos índices, obtidos nos dois sistemas celulares, após 120 horas de incubação.



**LEGENDA:**

- Estirpes do tipo 1
- ▲ Estirpes do tipo 3

Fig. 1 — Comparação entre os índices de neutralização (IN) das estirpes de poliovírus dos tipos 1 e 3, utilizando culturas primárias de rim de macaco rhesus (RMK) e células Hep-2, após 120 horas de incubação.

Foram repetidos os exames de cinco das estirpes do tipo 3, utilizando somente culturas de células Hep-2. Após um período de incubação de 120 horas, verificou-se a repetição do mesmo valor nos

índices de três estirpes e uma diferença de 0,25 log no valor dos índices das duas estirpes restantes. A identificação destas cinco estirpes foi a mesma das provas iniciais. A existência de pequenas variações nos valores absolutos dos índices de neutralização já foi anteriormente observada por Smit & Wilterdink<sup>11</sup> (1966), em provas repetidas, utilizando culturas de rim de macaco rhesus. Estas variações, entretanto, não influíram nos resultados de identificação das estirpes. Os resultados deste trabalho confirmam a observação dos autores citados em cultura de células Hep-2.

Durante o transcurso da investigação, as culturas de Hep-2 não evidenciaram envelhecimento precoce, mantendo-se sem maiores dificuldades durante sete dias, com uma troca ocasional do meio de manutenção de alguns tubos de cultura.

**CONCLUSÃO**

Sendo elevada a correspondência entre os índices de neutralização, particularmente após 120 h de incubação, e havendo concordância total nos resultados de identificação das estirpes estudadas nas culturas de rim de macaco rhesus e nas células Hep-2, conclui-se que estas últimas podem ser utilizadas, em substituição às primeiras, em provas de identificação sorológica intratípica, dos tipos 1 e 3, pelo método da “comparação dos índices de neutralização”, oferecendo as vantagens inerentes às linhagens de células contínuas.

STEWIEN, K.E. & LACERDA, J.P.G. de — [Application of the neutralization index comparison technique to the intratypic serodifferentiation of type 1 and 3 poliovirus strains, using Hep-2 cell cultures]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 9:221-8, 1975.

SUMMARY: *The Hep-2 cell line was compared to primary rhesus monkey kidney cell cultures (RMK) in the intratypic serodifferentiation of 28 type 1 and 3 poliovirus strains, by the method of comparison of neutralization indices. The correlation between the indices was high — 0.953 and 0.986 after incubation periods of three and five days, respectively — and all the strains showed the same identification result in both the cell systems studied. It is concluded that cultures of the Hep-2 cell line can be used as an alternative of the primary rhesus monkey kidney cell cultures in the intratypic differentiation of type 1 and 3 polioviruses by that method, with the inherent advantages to the continuous passage cell lines.*

UNITERMS: *Poliovirus. Neutralization indices. Cells, cultured.*

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CANDEIAS, J.A.N. — Isolamento e identificação intratípica de cepas de poliovírus associadas com a administração da vacina Sabin. São Paulo, 1969. p. 11. [Tese — Faculdade de Saúde Pública — USP]
2. COCKBURN, W.C. & DROZDOV, S.G. — Poliomyelitis in the world. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 42:405-17, 1970.
3. FURESZ, J. et al. — Genetic markers of poliovirus strains isolated from paralytic patients prior to and after Sabin vaccination programs. I Studies on type 1 strains. *Amer. J. Hyg.*, 80:45-54, 1964.
4. GELFAND, H.M. et al. — Serodifferentiation of poliovirus for studies of oral vaccine. *Publ. Hlth Rep.*, 77:941-5, 1962.
5. HENNEBERG, G. — Probleme der Schlu-ckimpfung gegen Poliomyelitis. *Munch. med. Wschr.*, 111:1701, 1969.
6. KOPROWSKI, H. et al. — The application of genetic markers to the development and control of live poliovirus vaccine. In: International Conference on Live Poliovirus Vaccines. 2nd.
7. McBRIDE, W.D. — Antigenic analysis of polioviruses by kinetic studies of serum neutralization. *Virology*, 7: 45-58, 1959.
8. MELNICK, J.L. — Population genetics applied to live poliovirus vaccine. *Amer. J. publ. Hlth.*, 50:472-83, 1962.
9. MELNICK, J.L. — Poliomyelitis vaccine: present status, suggested use, desirable developments. In: International Conference on the application of vaccines against viral, rickettsial, and bacterial diseases of man. Washington, D.C., Pan American Health Organization, 1971. p. 171-81. (Scient. publ., 226)
10. PLOTKIN, S.A. et al. — Intratypic serodifferentiation of polioviruses. *Virology*, 15:473-85, 1961.
11. SMIT, G.L. & WILTERDINK, J.B. — Intratypic serodifferentiation of polioviruses by comparison of neutralization indices and correlation of the antigenic marker and monkey neurovirulence I. Technical performance and evaluation of the method. *Arch. ges. Virusforsch.* 18: 261-7, 1966.
12. SMIT, G.L. & WILTERDINK, J.B. — Intratypic serodifferentiation of polioviruses by comparison of neutralization indices and correlation of the antigenic marker and monkey

---

STEWIEN, K.E. & LACERDA, J.P.G. de — Aplicação do método de 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.

---

- neurovirulence. II. Study of the antigenic character of Polio Type 1 strains isolated after oral vaccination. *Arch. ges. Virusforsch.* 18: 267-75, 1966.
13. 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.
14. WASSERMANN, F.E. & FOX, J.P. — Intratypic differentiation of poliovirus strains. I. Description of a simple method based on serum neutralization kinetics and its application to the study of human passage progeny of the LSc-2ab type 1 vaccine strains. *Arch. Path.* 74:275-84, 1962.
15. WEINSTEIN, L. — Poliomyelitis — a persistent problem. *New Engl. J. Med.*, 288:370-2, 1973.
16. WENNER, H.A. et al. — A comparative study of type 2 poliomyelitis viruses. II. Antigenic differences in relation to 18 type 2 strains. *J. Immunol.* 77:220-31, 1956.
- Recebido para publicação em 07-03-1975*  
*Aprovado para publicação em 04-04-1975*