

PRODUÇÃO DE UM ANTÍGENO DE SARAMPO POR MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO, COM RENDIMENTO E REPRODUTIBILIDADE*

Maria Isabel de OLIVEIRA**
Lourdes Rehder de Andrade VAZ DE LIMA**
Gildete Patriota de ANDRADE****
Luís Fernando de Macedo BRÍGIDO**
Ronaldo Zucатели MENDONÇA***

RIALA6/780

OLIVEIRA, M.I.; VAZ DE LIMA, L.R.A.; ANDRADE de, G.P.; BRÍGIDO, L.F.M.; MENDONÇA, R.Z.
- Produção de um antígeno de sarampo por multiplicidade de infecção, com bom rendimento e reprodutibilidade. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(1):25-29, 1995.

RESUMO: Sarampo é uma doença potencialmente grave e comum, cuja vacinação previne ou atenua as manifestações clínicas.

Métodos sorológicos utilizados na detecção de anticorpos para o vírus do sarampo têm sido empregados, como o teste de inibição da hemaglutinação e ELISA.

Para produção de antígeno do sarampo com maior rendimento, e melhor reprodutibilidade, realizamos estudos com diferentes multiplicidades de infecção (M.I.).

Nossos resultados levam-nos a sugerir que a produção de antígenos de sarampo é mais eficiente com a utilização de multiplicidade de infecção (M.I) de 0,01 com boa reprodutibilidade, tanto na preparação de ensaios de HA como de ELISA, devendo servir de parâmetro na preparação de antígenos em larga escala para uso em ensaios diagnósticos.

DESCRIPTORIOS: Sarampo. Multiplicidade de infecção. Produção de antígeno. Padronização de antígeno do sarampo.

INTRODUÇÃO

Casos suspeitos de sarampo, com exantema clinicamente indefinido, são comuns entre crianças vacinadas¹, havendo a necessidade de reduzir a incidência da doença e taxa de mortalidade, incluindo estratégias para erradicação do vírus, com a expansão das pesquisas virológicas e imunológicas^{1,8,9}.

Testes sorológicos tornam-se necessários para completar o diagnóstico clínico de casos suspeitos; assim sendo, vários métodos utilizados na detecção de

anticorpos para o vírus do sarampo já foram avaliados, como inibição da hemaglutinação (IHA), métodos imunoenzimáticos altamente sensíveis, como ELISA².

Neste trabalho, apresentamos os resultados das preparações do antígeno do sarampo, utilizando diferentes índices de multiplicidade de infecção (DICT₅₀/célula) com o objetivo de determinar a multiplicidade de infecção (M.I.) ideal, que está associada com baixa infectividade do vírus¹³, e dessa maneira obter uma padronização do antí-

* Realizado no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

** Divisão de Biologia Médica, Serviço de Virologia e Seção de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

*** Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantã, São Paulo, Brasil.

**** Departamento de Medicina Tropical, UFPE, Recife, PE, Brasil.

Correspondência: M.I. de Oliveira, Divisão de Biologia Médica, Serviço de Virologia, Instituto Adolfo Lutz - Av. Dr. Arnaldo, 351, Cep: 01246-902, São Paulo, Brasil.

geno, a ser utilizada nos testes ELISA e IHA, para detectar anticorpos específicos (IgM e IgG) para o sarampo.

MATERIAL E MÉTODO

VÍRUS

A cepa Edmonston de vírus do sarampo utilizada foi adaptada no laboratório do Instituto Adolfo Lutz, com título $DICT_{50}$ 10^7 /ml em cultura celular pelo método de Reed & Muench ⁴.

CULTIVO DO VÍRUS

Foram utilizadas células Vero (rim de macaco verde da África - ATCC-USA), crescidas em garrafas Roux, em Meio MEM - Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab - Campinas - S.P.). Após 48 horas de cultura, foi feita a contagem do número de células de 10 garrafas Roux, determinando-se pela média, de células por garrafa 5×10^7 células, utilizando-se este valor como cálculo na determinação da multiplicidade de infecção (M.I.), considerando-se como 1 M.I. a proporção de 1 $DICT_{50}$ /célula. As células foram infectadas com diferentes quantidades de vírus 0,01; 0,1; 1; 2 e 10 $DICT_{50}$ /célula, para determinar-se o inóculo ideal, ficando em contato por 2 horas a 37°C para adsorção. Após este período, as culturas receberam meio de manutenção (MEM-Eagle suplementado com 1% de SFB de SFB, 100 U/ml de penicilina e 40 mg/l de gentamicina) e foram mantidas a 37°C. As culturas foram observadas diariamente, apresentando efeito citopático (ECP) em 75% das células após 4 dias de infecção.

PREPARO DO ANTÍGENO PARA O TESTE DE IHA

O antígeno foi preparado em duas garrafas Roux de células Vero, utilizando-se a técnica descrita por Norrby⁷; com algumas modificações, na qual as células foram lisadas por ultrassom, e posteriormente tratadas com tween-éter.

Teste de Hemaglutinação (H.A)

De acordo com a técnica de Rosen¹⁰, o antígeno hemaglutinante foi titulado pela microtécnica, com uma unidade hemaglutinante (1 UHA) através de hemácias de macaco Rhesus.

PREPARO DO ANTÍGENO PARA O TESTE DE ELISA

O antígeno foi preparado em 2 garrafas Roux de células Vero, segundo a técnica descrita por Cremer et alii³, com algumas modificações, na qual as células foram lisadas por ultrassom e tratadas com desoxicolato de sódio.

Para controle negativo do antígeno, células não infectadas foram preparadas e processadas paralelamente.

Teste de Elisa

Utilizou-se a técnica descrita por Voller & Bidweel¹². O antígeno foi titulado em bloco com prévia determinação da concentração da proteína usando o método de LOWRY et alii⁶. As placas foram sensibilizadas com 5 μ g, 10 μ g, 20 μ g e 40 μ g de antígeno, por 18 horas de incubação em câmara úmida a 37°C. Os conjugados anti-IgM e anti-IgG humanos marcados com peroxidase, nas diluições 1: 2.500, 1: 5.000, 1:10.000, 1:20.000 foram incubados 1 hora a 37°C. O substrato foi utilizado contendo ácido cítrico, ortofenilenodiamina 10mg e peróxido de hidrogênio 30 volumes. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 2M. A leitura do teste de ELISA foi feita em aparelho "Multiskan Plus Version 2,02" utilizando-se filtro para comprimento de onda 460 nm. Os soros com uma D.O. > 0,044 e > 0,11 foram considerados positivos para IgM e IgG respectivamente.

Foram preparados 5 lotes de antígeno HA e ELISA com 0,01 a 10 $DICT_{50}$ /célula.

Soros Referência

Os soros utilizados para detectar anticorpos IgG e IgM humanos foram fornecidos pelo Center for Diseases Control, Atlanta Ga. (C.D.C.), com alto e baixo título. Usaram-se as diluições do soro referência de 1:80 e 1:160 para anticorpos IgM e IgG humanos, critérios obtidos a partir do valor de corte "cutoff" para positividade. Utilizou-se soro de 25 crianças antes da vacinação com negatividade para o teste de inibição da hemaglutinação (IHA) e imunofluorescência indireta (IFI), que foram submetidas ao teste de ELISA.

RESULTADOS

Das preparações virais, as que representam melhores resultados na produção de antígeno do sarampo, para o teste de hemaglutinação (1 UHA) foram as obtidas em culturas infectadas com 0.01

DICT₅₀/célula. Nestas condições, o antígeno apresentou um título de 512 HA.

Da mesma forma, o melhor antígeno para ELISA foi obtido quando as culturas foram infectadas com 0,01 DICT₅₀/célula de acordo com a figura 1.

Nestas condições (0,01 M.I.), este antígeno apresentou os mesmos valores do antígeno anterior (HA) quando foi titulado pela reação de hemaglu-

Para este experimento, foram utilizados antígenos obtidos de culturas infectadas com 0,01; 0,1; 1; 2 e 10 DICT₅₀/célula, em placas sensibilizadas com 5 μ g; 10 μ g; 20 μ g ou 40 μ g desses antígenos e com conjugados IgG e IgM diluídos na razão de 1:2.500 a 1:20.000. O soro referência foi diluído conforme descrito. Utilizando-se uma concentração de antígeno de 10 μ g/ml e de conjugado na diluição de 1:10.000, conseguiu-se alta reprodutibilidade para os vários experimentos realizados nas mesmas condições, o qual

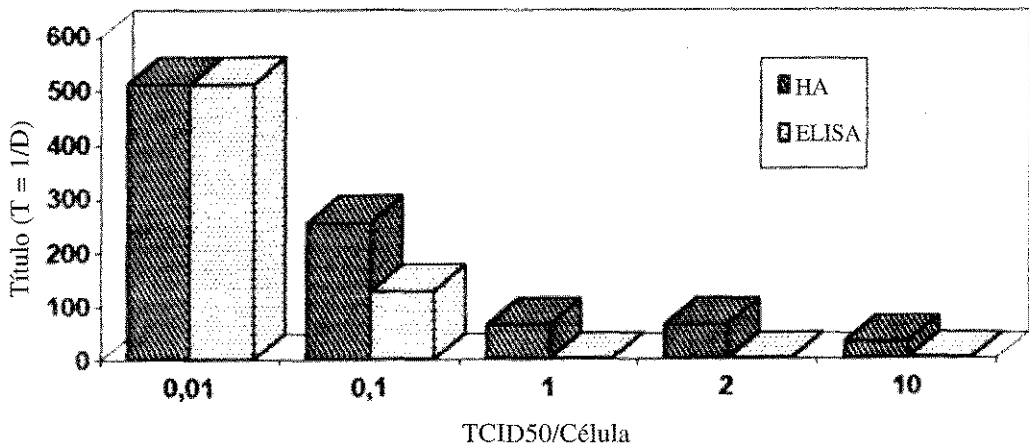


FIGURA 1

Correlação da atividade hemaglutinante dos antígenos de vírus do sarampo produzido em células Vero utilizando diferentes multiplicidade de infecção, preparados com as técnicas de hemaglutinação e ELISA.

tinação, enquanto que o antígeno obtido de culturas infectadas com 1; 2 ou 10 DICT₅₀/célula não apresentou bons resultados para o teste de ELISA.

Para determinar a diluição ideal do antígeno para o teste, este foi titulado em bloco pela reação de ELISA, sendo obtido como limite de positividade para IgG a D.O. > 0,044 e para IgM a D.O. > 0,11, utilizando como controle células não infectadas, e soros negativos para determinação do limite de corte.

apresentaram valores similares para detectar anticorpos IgG e IgM pelo teste de ELISA.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a utilização de multiplicidades de infecção (M.I.) baixas, em torno de 0,01, apresentam índices mais satisfatórios e reprodutíveis tanto na preparação de antígenos para o teste de HA como para o teste de ELISA. Observa-

mos ainda que quanto maior a proporção de vírus por célula, menor foi o rendimento final do antígeno. Esta diferença foi mais marcante no preparo de antígeno para o teste de ELISA, sendo que culturas infectadas com uma multiplicidade de infecção maior ou igual a 1 não apresentam títulos hemaglutinantes.

A concentração ideal de antígeno para o teste de ELISA foi obtida quando as placas foram sensibilizadas com 10µg, e com uma diluição do conjugado de 1:10.000. Nessas condições, uma maior reprodutibilidade foi obtida quando utilizada para detectar anticorpo IgM, em relação a IgG.

O método de preparação do antígeno com a utilização de desoxicolato de sódio para ELISA e de tween-éter para a reação da hemaglutinação, aparentemente não interferiu nos títulos, pelo menos quando a concentração de vírus usada foi de 0,01 DICT₅₀/célula.

Outros autores têm relatado diferentes proporções de vírus/célula (M.I) para a produção do vírus do sarampo. Hankins & Black⁵ utilizaram 10 DICT₅₀/célula (10m.o.i = multiplicity of infection) no preparo de antígeno para o teste de Western blot. Udem¹³ utilizou uma multiplicidade de infecção de 0.01 a 0.1 DICT₅₀/célula.) para detectar condições de propagação e purificação em alto rendimento de infectividade de vírus. Norrby⁷ citou apenas que a infectividade do

vírus foi determinada através do método de Reed e Muench, não descrevendo qual o título utilizado para obter antígeno hemaglutinante.

Observa-se grande variação nos resultados quando células são infectadas com diferentes multiplicidades de infecção. Nossos resultados levam-nos a sugerir que otimizando o inóculo, mais eficiente se torna a replicação viral, gerando maiores títulos. O vírus assim obtido pode ser utilizado para a produção de antígenos, independente da metodologia utilizada no seu preparo.

Verificamos que a produção de antígenos de sarampo com a utilização de multiplicidade de infecção de 0,01, foi a que apresentou melhor eficiência de vários experimentos realizados nas mesmas condições. Apresentaram valores similares, tanto na preparação de ensaios de HA como de ELISA, devendo servir de parâmetro nas preparações de antígenos de sarampo em larga escala, para uso em ensaios diagnósticos, usando a cepa Edmonston do vírus.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos o Dr. Luiz Forêncio de Salles Gomes por suas valiosas sugestões na elaboração deste texto.

RIALA6/780

OLIVEIRA, M.I.; VAZ de LIMA, L.R.A.; ANDRADE, G.P.; BRÍGIDO, L.F.; MENDONÇA, R.Z. - The role of m.o.i. in standardization of measles antigen preparation. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(1):25-29, 1995.

ABSTRACT: Measles is a prevalent and potentially severe disease in developing countries. The two methods widely used for diagnosis are ELISA and IHA. We studied different multiplicities of infections (m.o.i) to determine the ideal moi for the preparation of antigens for these assays. We conclude that the use of low (m.o.i.0,01) viral titers are most useful for both the ELISA and IHA methods. The different preparation of antigens for these assays do not seem to influence their usage.

DESCRIPTORS: Multiplicities of infections. Standardization measles antigen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BILLETER, M.A.; BELLINI, W.; BINNENDIJK, R.S. et alii. The pathogenic aspects of measles virus infection: Memorandum from a who meeting. *Bull. Who.* 72(2): 199-206, 1994.
2. CHEN, R.T.; MARKOWITZ, L.E.; ALBRECHT, P.; JOHN, A.S. MOFENSON, L.M.; PREBLUD, S.R. & ORENSTEIN, - W.A. Measles antigen: Reevaluation of protective titers. *J. Infect. Dis.* 162:1036-1042,1990.
3. CREMER, N.E.; COSSEN, C.K.; SHELL, G.; DIGGS, J.; GALLO, D. & SCHMIDT, N.J. Enzyme Immunoassay versus plaque neutralization and other methods for determination of immune status to measles and varicella-zoster viruses and versus complement fixation for serodiagnosis of infections with those viruses. *J. Clin. Microbiol.* 6: 869-874, 1985.

4. DAVIS Bernard, - 2ª edição, Tradução de R. A. A. Moura. S.P. Harper e Row. *Natureza do vírus.V.4*, p. 1258-1261. 1980.
5. HANKINS, R.W & BLACK, FL - Western blot analyses of measles virus antibody in normal persons and in patients with multiple sclerosis subacute. *Clin Microbiol.* 9: 324 - 329, 1986.
6. LOWRY, O.H.; ROSEMBROUGH, H.J.; FARR, L.& RANDALL, R. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 263-75, 1951.
7. NORRBY, E. - Hemagglutination by measles virus IV. A simple procedure for production of high potency antigen for hemagglutination-inhibition (HI) tests. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 11:814-818, 1992.
8. NORRBY, E. - Hemagglutination by measles virus III. Identification of two different hemagglutinins. *Virology.* 19:147 - 157, 1963.
9. PANNUTTI, C.S.; MORAES, J.C.; SOUZA, V.A.V.F., CAMARGO, M.C.C.; HIDALGO, M.T.R. & Others. - Measles antibody prevalence after mass immunization in S.Paulo, Brasil, *Bull Who.* 69 (5): 557-560, 1991.
10. ROSEN, L. - Hemagglutination and hemagglutination-inhibition with measles virus. *Virology* 13: 139-41, 1961.
11. ROTA, J.S.; HUMMEL, K.B.; ROTA, P. & BELLINI, W. J. - Genetic variability of the glycoprotein genes of current wild-type measles isolates. *Virology.* 188: 135 - 142, 1992.
12. VOLLER, A. & BIDWELL, D.E. - Enzyme-immunoassay for antibodies in measles, cytomegalovirus infection and after rubella vaccination. *Br. J. Exp. Pathol.*, 57:243-7, 1976.
13. UDEM, S.A. -Measles virus: Conditions for the propagation and purification of infectious virus in high yield. *J. Virological Methods.* 8: 123-136, 1984.

Recebido para publicação em 29/08/94

