

A IMUNOHEMADSORÇÃO, ATRAVÉS DE RECEPTORES Fc, COMO PROVA DIFERENCIAL NO ISOLAMENTO DE HERPETOVÍRUS*

Ricardo Ishak

Centro de Ciências Biológicas UFPA
Deptº de Patologia, Laboratório de Virologia
Campus Universitário do Guamã
66000 Belém PA, Brasil

Warren A. Andiman

Yale University, School of Medicine
Department of Epidemiology and Public Health
New Haven, Connecticut, USA

Maria de Lourdes C. Gomes

& Célia M. Nakauth
Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia
Av. Almirante Barroso, 492
66000 Belém PA, Brasil

Resumo

O aparecimento de receptores, para a porção Fc da imunoglobulina G, na membrana de células infectadas por herpesvírus, é aproveitado como teste diferencial, para identificação de isolamentos destes agentes. A imunohemadsorção, prova que se realiza na detecção daqueles receptores, é uma técnica rápida, econômica, simples, sensível, específica, reproduzível, confiável e segura que pode ser usada com sucesso para esta finalidade.

Summary

Immunehemadsorption through Fc receptors as a differential routine test in the isolation of herpesvirus

Receptors for the Fc portion of the immunoglobulin G appear onto the surface membrane of herpesvirus-infected cells. This is useful as a differential test to identify isolations of those viral agents. Immunehemadsorption, one of the ways one can detect those receptors, is a rapid, economic, simple, sensitive, specific, reliable and safe technique to be used with success to this aim.

Introdução

Desde a primeira metade dos anos 60, vários trabalhos descreveram a distribuição de receptores Fc (RFC), em grande variedade de células, como neutrófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos, plaquetas, linfócitos e populações de células malignizadas. Em 1964, foi mostrado que células infectadas pelo vírus herpes simples (VHS), podiam hemad-

* Trabalho realizado no Laboratory of Clinical Investigation, Yale University, USA, e na Seção de Virologia do Instituto de Patologia Tropical UFGO.

sorver eritrócitos de carneiro(2,8,9,13,18).

A hemadsorção descrita apresentava uma etapa, além da então recentemente descrita, aderência de eritrócitos a monocamadas, pelo vírus da *influenza* (12). Com o VHS, os eritrócitos eram recobertos por um soro de coelho, com atividade anti-eritrócito de carneiro. A hemadsorção era mediada por estas moléculas de imunoglobulina, que revestiam o eritrócito e, mais especificamente, através da porção Fc da imunoglobulina G (IgG). Foi presumido, e mais tarde comprovado, que as células infectadas pelo VHS desenvolviam, em sua superfície, afinidade para a região Fc da IgG(18).

A detecção de RFC varia com o estágio da infecção, porém, em geral, seu aparecimento dá-se no início do ciclo replicativo do vírus(6,14,15). Entre os herpesvírus, a expressão de RFC já foi mostrada, em células infectadas pelo VHS-1(4,13,16), VHS-2(3), citomegalovírus humano(5,7,10,15), citomegalovírus do macaco (Hsiung, G.D., comunicação pessoal), vírus herpes-like do cobaio(6), citomegalovírus de cobaio(6), vírus de Epstein-Barr(1,11) e células de hamster transformadas pelo VHS-1 e VHS-2(17).

Este trabalho visa mostrar a utilidade de RFC, no laboratório de diagnóstico de vírus, pelo uso de uma técnica simples e altamente lucrativa em termos de resultados, a imunohemadsorção.

Material e Métodos

Culturas celulares - Foram utilizadas duas linhagens de células Vero (LCI e IEC) e uma linhagem diplóide, de fibroblastos de placenta humana (FPH), com empregos dos meios MEME, 199 e BME, respectivamente, suplementados com soro bovino fetal a 10%, para crescimento e, a 5%, para manutenção, com exceção da linhagem VERO-IEC, a qual era suplementada com soro bovino fetal, na proporção de 5% e 2%, respectivamente.

As linhagens estoque eram dispersadas, após tratamento com tripsina, a 0,25% e mantidas, após semeadura, a 37°C. Ao meio de manutenção e crescimento eram adicionados penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (100µg/ml) e fungizone (1-3µg/ml).

Cepas virais - A cepa VHS-LCI foi proveniente de isolamento, a partir de lesões vaginais de paciente que se apresentou ao laboratório de vírus do Laboratory of Clinical Investigations (LCI), Yale University, New Haven, Connecticut, USA. Como a maioria do trabalho foi desenvolvida com esta cepa, preparou-se um estoque de vírus em FPH por métodos padrões(6).

A cepa VHS-IPT originou-se de isolamento a partir de lesões do prepúcio de paciente que se apresentou ao laboratório de diagnóstico de vírus do Instituto de Patologia Tropical da UFGO, Goiânia, Goiás (Ishak,R., dados não publicados).

As cepas de poliovírus 2 e coxsackie B4 foram amostras de teste de controle de qualidade do Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA; o adenovírus foi originado de isolamento a partir de swab de nasofaringe feito no LCI.

Eritrócitos - Sangue total de carneiro, em solução de Alsever, era obtido semanalmente, da Baltimore Biological Laboratory (BBL) ou coletado de animais mantidos no biotério do IPT-UFGO.

LCI e soro de coelho, com atividade anti-eritrócito de carneiro (SCAC), adveio de fonte comercial (BBL).

Sensibilização de eritrócitos - Este termo é usado para denotar o revestimento dos eritrócitos, com seu respectivo antisoro. Consiste em misturar partes iguais de suspensão a 2% (em PBS, pH 7,2), de eritrócitos de carneiro, com SCAC, em diluição não-aglutinante. A mistura é incubada por 30 minutos, a 37°C e, após três lavagens com PBS, uma suspensão a 0,5% (em PBS) é preparada para uso. Eritrócitos "sensibilizados" com soro não-homólogo eram usados como controle.

Imunohemadsorção (IHd) - Esta técnica foi realizada segundo procedimento previamente descrito (13,16), em tubos contendo monocamadas celulares infectadas. Como controle, eram utilizados tubos não-infectados. A IHd consiste em remover o meio de manutenção, lavar a monocamada por duas vezes com PBS e adicionar 0,5ml/tubo de eritrócitos sensibilizados (a 0,5%). Incuba-se por uma hora, a temperatura ambiente, faz-se uma lavagem com PBS, para remover o excesso de eritrócitos e procede-se a leitura, à microscopia óptica comum. A positividade do teste é determinada pelo aparecimento de rosetas, isto é, quando existam pelo menos cinco ou mais eritrócitos, em volta de cada célula da monocamada.

Deteção de Mycoplasma em linhagens celulares - Células da linhagem Vero-IEC, com 4-7 dias de semeadura, eram tripsinizadas e semeadas (0,2ml) em placas, contendo mistura de Bacto PLO Agar (Difco) e Mycoplasma Enrichment (Eaton Agent Enrichment), na proporção de sete para três. As placas eram incubadas em aerobiose e após dois dias, eram observadas em microscópio invertido. As placas positivas mostravam colônias arredondadas, com a porção central mais densa que a periférica, com o aspecto de um ovo frito. As colônias possuíam desenvolvimento para o interior do agar e, quando coradas pelo corante de Dienes (diluído 1:100 em solução salina), após uma hora a temperatura ambiente, mostravam-se com azul escuro, na porção central e azul claro, na periferia. Ambas características são propriedades de *Mycoplasma*.

Resultados

A IHd como um teste diagnóstico - O primeiro objetivo foi tentar utilizar a característica de células infectadas por herpesvírus, a expressão de Rfc, em um teste rápido, para o diagnóstico, pois já existiam evidências de que estes receptores apareciam tão cedo quanto seis horas, após a infecção (14,16). Assim, para determinar a sensibilidade da IHd, em detectar a replicação viral, a nível de início de infecção ("early infection"), foram testados tubos com monocamadas Vero-LCI com VHS-LCI em duas diluições (Tabela 1). O vírus foi inoculado com baixo MOI (Multiplicity of Infection) de $\leq 3 \times 10^{-2}$ partículas infecciosas/célula, para evitar a lise da monocamada, em tempo muito curto e para tentar aproximar a quantidade do inóculo, que é encontrado em muitos espécimes que chegam ao laboratório.

O teste não foi suficientemente sensível, para servir de diagnóstico. Primeiro, as rosetas não precederam o aparecimento de efeito citopático (ECP). Além disso, a formação de rosetas, em geral, ocorria apenas ao redor de focos de ECP. Tubos controle foram todos negativos.

Especificidade dos Rfc - Com a finalidade de investigar a possibilidade de que os Rfc pudessem aparecer como modificação física inespe-

Tabela 1 - Sensibilidade da imunohemadsorção, como um teste para a detecção rápida de células Vero (linhagem LCI) infectadas pelo vírus do herpes simples (cepa LCI) (1)

Técnicas	Horas após a infecção									
	5	6	7	8	9	10	11	12	24	48
ECP (diluição 10^{-1})	0	0	?	+	1+	1+	1+	1+	2+	3+
Imunohemadsorção	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
ECP (diluição 10^{-2}) (2)	0							+	1+	2+
Imunohemadsorção	0							+	+	+

(1) Veja o texto para detalhes técnicos.

(2) Espaços em branco significam "não realizado".

cífica, da membrana plasmática, durante um ciclo lítico, infectaram-se linhagens celulares com cepas de poliovírus tipo 1, coxsackie B4 e um adenovírus. Esperou-se a possibilidade de que o ECP, causado pelos herpetovírus, levando ao arredondamento da célula e alterações do plasmalema, pudesse, por si só, levar à ligação da IgG à célula infectada. Estes três vírus, os quais em seu ECP também levam ao arredondamento de células, não causaram a formação de rosetas durante a reação de IHd.

Para tentar comprovar, ainda, a especificidade dos RFC com os herpetovírus e se o fato de uma contaminação da linhagem celular por *Mycoplasma*, muito comum dentro do laboratório de vírus, poderiam interferir na expressão desses receptores, inoculou-se a cepa VHS-IPT na linhagem celular Vero-IEC. A reação de IHd não foi diferente daquela observada em linhagens não contaminadas.

Discussão

A evidência de que RFC aparecem em células infectadas por herpetovírus, até seis horas após a infecção (14,16), foi encorajadora para a adaptação do teste de IHd, para fins de diagnóstico rápido de viroses.

Outros investigadores, usando inóculos com um alto MOI, já reportaram a formação de rosetas, após seis horas de infecção (3,14), mas o nosso sistema de IHd, para detecção de RFC não foi sensível, o suficiente, para detectar os receptores, nesta fase do ciclo lítico, quando se usou inóculos de baixo MOI. Além disso, os trabalhos citados não comentam o aparecimento de ECP; em nosso sistema, ECP e IHd ocorreram simultaneamente. Este fato, a nosso ver, é de pouco valor, no diagnóstico rápido, pois o ECP dos herpetovírus, na maioria das vezes, é bastante característico. Em um dos trabalhos citados, Westmoreland & Watkins (16) utilizaram-se de autoradiografia, para detecção de receptores. Apesar do método ser altamente sensível para este fim, é uma metodologia cara e tediosa, para o laboratório de diagnóstico, o qual lucra mais a simples visualização do ECP.

riamente, baseando-se, unicamente, no ECP do agente em culturas celulares. Este parâmetro, entretanto, nem sempre é tão característico, variando até mesmo entre cepas do mesmo vírus. Sugerimos, então, a adição de uma prova diferencial, a IHD, para o diagnóstico de agentes da família *Herpesviridae*, em particular para o VHS e o citomegalovírus humano. Esta técnica pode ser de grande valor, na diferenciação de certos isolamentos atípicos destes dois vírus, além de separá-los do vírus da varicela-zoster, o qual, aparentemente, não mostrou, até o momento, a propriedade de induzir RFC, em células que infecta(6).

O procedimento da IHD dá resultado, facilmente evidenciado, através de microscopia óptica comum e tem mostrado ser uma técnica rápida (leva no máximo 2:30 horas), econômica (os reagentes são encontrados facilmente e a preços acessíveis), simples (qualquer indivíduo é capaz de realizá-la), sensível (desde que tenha ECP, o teste será positivo), específica (somente os herpesvírus têm mostrado reação positiva), reproduzível (dois indivíduos diferentes são capazes de chegar ao mesmo resultado), confiável (duas cepas diferentes levam à formação de rosetas) e segura (com uma chama, uma cuba para descarte do material e o trabalho sendo realizado em câmara asséptica, o perigo de contaminação, para o manipulador, reduz-se a zero).

Até mesmo o fato da linhagem celular estar contaminada, por um agente comum dentro do laboratório, como são *Mycoplasma*, não interfere na expressão de RFC, o que lhe dá ainda maior valia, como uma prova diferencial, rápida, no laboratório de diagnóstico de viroses.

Referências Bibliográficas

1. Andiman, W.A. & Miller, G. - Properties of Epstein-Barr virus transformed wooly monkey lymphoblastoid cell lines (40083). Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 157:488-492, 1978.
2. Costa, J.C. & Rabson, A.S. - Role of Fc receptors in herpes simplex virus infection. Lancet, 1:77-78, 1975.
3. Costa, J.; Rabson, A.S.; Yee, C. & Tralka, T.S. - Immunoglobulin binding to herpes-virus induced Fc receptors inhibits virus growth. Nature, 269:251-252, 1977.
4. Feorino, P.M.; Shore, S.L. & Reimer, C.B. - Detection by immunofluorescence of Fc receptors in cells acutely infected with herpes simplex virus. International Archives of Allergy and Applied Immunology, 53:222-233, 1977.
5. Furukawa, T.; Hornberger, E.; Sakuma, S. & Plotkin, S.A. - Demonstration of immunoglobulin G receptors induced by human cytomegalovirus. Journal of Clinical Microbiology, 2:333-336, 1975.
6. Ishak, R. - Induction of receptors for the Fc portion of immunoglobulin G by herpes-virus infected cells. Yale University, New Haven, Connecticut, USA, 1978. (Thesis).
7. Keller, R.; Peitchel, R.; Goldman, J.N. & Goldman, N. - An IgG-Fc receptor induced in cytomegalovirus-infected human fibroblasts. Journal of Immunology, 116:772-777, 1976.
8. Kerbel, R.S. - Herpes virus induction of Fc receptors. Nature, 263:192, 1976.
9. Kerbel, R.S. & Davies, A.J.S. - The possible biological signifi-

cance of Fc receptors on mammalian lymphocytes and tumor cells. *Cell*, 3:105-112, 1974.

10. Rahman, A.A.; Teaschner, M.; Sethi, K.K. & Brandis, H. - Appearance of IgG (Fc) receptor(s) on cultured human fibroblasts infected with human cytomegalovirus. *Journal of Immunology*, 117:252-258, 1976.
11. Robinson, J.E.; Andiman, W.A.; Henderson, E. & Miller, G. - Host-determined differences in expression of surface marker characteristics on human and simian lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 74:749-753, 1977.
12. Vogel, J. & Shelokov, A. - Absorption-hemagglutination test for influenza virus in monkey kidney tissue culture. *Science*, 126:358-359, 1957.
13. Watkins, J.F. - Adsorption of sensitized sheep erythrocytes to HeLa cells infected with herpes simplex virus. *Nature*, 202:1364-1365, 1964.
14. Watkins, J.F. - The relationship of the herpes simplex hemadsorption phenomenon to the virus growth cycle. *Virology*, 26:746-753, 1965.
15. Westmoreland, D.; Jear, S.St. & Rapp, F. - The development of cytomegalovirus-infected cells of binding affinity for normal human immunoglobulin. *Journal of Immunology*, 116:1566-1570, 1976.
16. Westmoreland, D. & Watkins, J.F. - The IgG receptor induced by herpes simplex virus: studies using radioiodinated IgG. *Journal of General Virology*, 24:167-178, 1974.
17. Westmoreland, D.; Watkins, J.F. & Rapp, F. - Demonstration of a receptor for IgG in syrian hamster cells transformed with herpes simplex virus. *Journal of General Virology*, 25:167-170, 1974.
18. Yasuda, J. & Milgrom, F. - Hemadsorption by herpes simplex infected cell cultures. *International Archives of Allergy*, 33:151-170, 1978.