

## REAÇÃO DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO PARA O VIRUS DA RUBÉOLA — TÉCNICA SIMPLIFICADA \*

J. A. N. Candeias \*  
Lucia Neira \*\*\*  
M. L. RácZ \*\*  
Nelly M. F. Candeias \*\*\*\*

RSPUB9/438

CANDEIAS, J. A. N. et al. *Reação de inibição da hemaglutinação para o vírus da rubéola — Técnica simplificada.* Rev. Saúde públ., S. Paulo, 12: 516-22, 1978.

RESUMO: A comparação dos resultados obtidos com uma técnica simplificada de inibição da hemaglutinação para o vírus da rubéola e a técnica padronizada pelo "Center for Disease Control", permitiu determinar índices de sensibilidade e especificidade da técnica simplificada em relação à técnica padrão de, respectivamente, 99,4% e 90,0%. Esta técnica pode facilitar a execução de levantamentos sorológicos para a rubéola em larga escala.

UNITERMOS: Rubéola, vírus. Hemaglutinação. Anticorpos inibidores.

### INTRODUÇÃO

O diagnóstico sorológico da rubéola pode ser feito mediante o emprego de reações de inibição da hemaglutinação<sup>21</sup>, neutralização<sup>14,15</sup>, fixação do complemento<sup>12,19,20</sup>, imunofluorescência indireta<sup>1</sup> e, mais recentemente, pela utilização de técnicas imunoenzimáticas<sup>25</sup> e de hemólise radial específica<sup>8</sup>. Dentre estas, a inibição da hemaglutinação tem sido a reação de uso mais generalizado, tanto no diagnóstico clínico, como nos inquéritos sorológicos, dadas sua especificidade, sensibilidade e relativa simplicidade de execução<sup>2-4,6,17,18,23,24</sup>. No

entanto, não é esta reação destituída, de todo, de certos problemas que a tornam de difícil reprodutibilidade e com resultados, por vezes, difíceis de interpretar, razões pelas quais o "Center for Disease Control" (CDC)<sup>5</sup> definiu as normas para sua padronização, tanto em relação à titulação do antígeno, quanto em relação ao tipo e concentração das hemácias a utilizar e tipo de tratamento para remoção de aglutininas naturais e inibidores inespecíficos da hemaglutinação. Seguindo, fundamentalmente, estas normas, foram feitas tentativas no

\* Pesquisa financiada pelo Departamento de Assistência Escolar da Secretaria de Educação da Prefeitura Municipal de São Paulo.

\*\* Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP — "Setor Saúde Pública" — Av. Dr. Arnaldo, 715 — 01255 — São Paulo, SP — Brasil.

\*\*\* Estagiária do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP — "Setor Saúde Pública".

\*\*\*\* Do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP — Av. Dr. Arnaldo, 715 — 01255 — São Paulo, SP — Brasil.

sentido de tornar a reação mais acessível a laboratórios que não tenham condições de dispor de aparelhagem dispendiosa e em que o número de reações a realizar, diariamente, seja relativamente elevado.

Apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos, ao mesmo tempo que se sugere a possibilidade de utilização da presente técnica modificada.

#### MATERIAL E MÉTODOS

##### *Soros de prova*

As 201 amostras de soro, selecionadas para o presente estudo, provieram de um total de 2.153 soros a serem testados, qualitativamente, para determinação do grau de imunidade para a rubéola de professoras da rede municipal de ensino de São Paulo. Aquelas amostras foram testadas, quantitativamente, para a pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação segundo a técnica padronizada pelo CDC e, simultaneamente, pela técnica simplificada, que passamos a identificar como técnica ICB, iniciais de Instituto de Ciências Biomédicas.

##### *Reação de inibição da hemaglutinação*

Esta reação foi realizada em triplicata pelo método de microtitulação em placas "V" (Cooke Engineering Co.), com volumes 25 e 50 microlitros, seguindo-se, em paralelo, as operações estabelecidas pelo CDC e as que fixamos para a reação simplificada, operações estas que são descritas na Tabela 1. O antígeno utilizado, de origem comercial\*, era titulado antes da execução da reação de inibição da hemaglutinação, de modo a poder ser confirmada a utilização de 4 unidades de antígeno, em cada reação. Os soros foram testados nas diluições de 1:8 até 1:256.

#### RESULTADOS

A distribuição dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação obtidos com as técnicas CDC e ICB é apresentado na Tabela 2. Na dosagem de anticorpos inibidores da hemaglutinação pela técnica CDC, conforme pode calcular-se, pelos resultados apresentados nessa Tabela, 90,1%

TABELA 1

Número e tipo de operações a serem executadas segundo a técnica padrão (CDC) e a técnica modificada (ICB)

| Técnica padrão (CDC)   | Técnica modificada (ICB)   |
|--|--|
| 1. Misturar: 0,2ml de soro<br>0,3ml de HSAG<br>0,2ml de Heparina-MnCl <sub>2</sub> | 1. Misturar: 0,1ml de soro<br>0,1ml de Heparina-MnCl <sub>2</sub><br>0,6ml de HSAG<br>0,05ml de papa de hemácias |
| 2. Incubar: 4°C durante 15 min   | 2. Incubar: 4°C durante 120 min *  |
| 3. Adicionar: 0,2ml de hemácias a 50%  |  |
| 4. Incubar: 4°C durante 60 min   |  |
| 5. Adicionar: 0,8ml de HSAG  |  |
| 6. Centrifugar: 900g/4°C durante 15 min  | 3. Centrifugar: 2000g/t.a. durante 5 min   |

\* Agitar cada 30 minutos

\* Flow Laboratories, Inc. Rockville, U.S.A.

TABELA 2

Distribuição dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação segundo a técnica padrão (CDC) e a técnica modificada (ICB)

| Técnica Padrão (CDC) \ Técnica Modificada (ICB) | Títulos Hemaglutinantes |   |    |    |    |     |       | Total |
|---|-------------------------|---|----|----|----|-----|-------|-------|
|   | < 8                     | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | ≥ 256 |       |
| < 8   | 18                      |   | 1  | 1  |    |     |       | 20    |
| 8   | 1                       | 2 |    | 2  |    |     |       | 5     |
| 16  |                         | 1 | 8  | 4  | 3  |     |       | 16    |
| 32  |                         |   | 1  | 13 | 15 |     |       | 29    |
| 64  |                         |   |    | 3  | 48 | 23  | 1     | 75    |
| 128   |                         |   |    |    | 6  | 24  | 6     | 36    |
| ≥ 256   |                         |   |    |    | 1  | 6   | 13    | 20    |
| Total   | 19                      | 3 | 10 | 23 | 73 | 53  | 20    | 201   |

X<sup>2</sup> observado = 55.49

TABELA 3

Distribuição dos resultados da reação de inibição da hemaglutinação segundo a técnica padrão (CDC) e a técnica modificada (ICB).

| Técnica padrão (CDC) \ Técnica modificada (ICB) | Reação Negativa | Reação Positiva | Total |
|---|-----------------|-----------------|-------|
|   | < 8             | ≥ 8             |       |
| Reação Negativa                                 | 18              | 2               | 20    |
| Reação Positiva                                 | 1               | 180             | 181   |
| Total   | 19              | 182             | 201   |

das amostras testadas apresentaram títulos iguais ou superiores a 8, enquanto pela técnica ICB esta percentagem foi de 90,5%. Na Tabela 3, faz-se a associação dos resul-

tados obtidos com as duas técnicas já mencionadas, sendo possível avaliar a percentagem de eventos concordantes das mesmas, que para as reações positivas

(>8) é de 99,4% e para as reações negativas (<8) de 90,0%. Estes valores percentuais expressam a sensibilidade e a especificidade da técnica ICB em relação à técnica CDC<sup>22</sup>.

#### DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O fato da rubéola poder desencadear o aparecimento de malformações congênitas tem forçado o desenvolvimento de extensos programas de vacinação, tanto em crianças de idade superior a um ano, quanto em mulheres adultas, respeitadas, neste último caso, três normas fundamentais: determinação do grau de imunidade do indivíduo a vacinar, proibição da vacinação nos casos de gravidez e recomendação de que a mulher vacinada não engravide, durante o três meses que se seguem ao processo vacinal. De um modo geral, estas normas de vacinação diminuem os riscos de ocorrências de malformações congênitas ocasionadas pelo vírus da rubéola; persistem, no entanto, situações particulares que requerem uma discussão mais pormenorizada deste problema<sup>11,16,26</sup>.

Sempre que está presente uma situação de gravidez, considerando-se a frequência com que ocorrem as formas sub-clínicas de rubéola e o fato de que mesmo as formas clínicas típicas, muitas vezes, não possuem características patognomônicas, o diagnóstico sorológico torna-se obrigatório<sup>27</sup>. Alguns autores chegam mesmo a considerar que a pesquisa de anticorpos contra a rubéola deve constituir-se em prática rotineira, numa tentativa de contornar situações que, invariavelmente, levam a "crises emocionais", por suspeita de contato da paciente grávida com casos de rubéola, quer em ambiente familiar ou não<sup>6,18</sup>. Dentro deste contexto, pode mesmo sugerir-se que da prática de assistência, durante o período interconcepcional, faça parte um conteúdo educativo visando ao esclarecimento da mãe sobre a problemática da rubéola. Poder-se-á orientar a mãe no sentido de averiguar o nível de imunidade

que possui, o que ditará a necessidade ou não de ser vacinada; haverá oportunidade para esclarecê-la das vantagens em informar o médico sobre sintomas que simulem um quadro de rubéola e que se tenham manifestado em qualquer membro da família; com relativa frequência será possível minorar estados de profunda ansiedade em mulheres grávidas, com a informação de que o caso com que houve suspeita de contato pode não ter sido de rubéola. Deste modo, abre-se campo para a Educação em Saúde colaborar em programas que venham a reduzir as trágicas conseqüências da infecção do feto pelo vírus da rubéola, programas estes que configurem a proteção global da mãe, da criança e da própria família. São oportunas as palavras de Chute<sup>7</sup> quando diz que "...a participação entusiástica da comunidade em programas flexíveis e de múltipla natureza que se desenvolvam com vistas à imunização contra a rubéola, de ênfase prioritária na criança, mas suplementados com a proteção direta das mulheres suscetíveis adultas, poderá vir a eliminar o problema da rubéola, em futuro próximo".

Dada a precariedade do diagnóstico clínico, os pacientes com quadros suspeitos de rubéola devem ser submetidos, com urgência, a um diagnóstico preciso. O diagnóstico laboratorial da rubéola ampara-se, fundamentalmente, nas provas sorológicas, das quais a inibição da hemaglutinação é a preferida, pela relativa rapidez com que pode ser executada e pela segurança dos dados que fornece, desde que as amostras de sangue das fases aguda e convalescente sejam obtidas respectivamente, dentro de 48h e 15 dias. Assim, muitas das ações tomadas pelo médico frente a um caso de rubéola numa gestante, vão depender dos resultados fornecidos pela reação de inibição da hemaglutinação. A pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o vírus da rubéola, além de amparar a decisão do médico, vai ainda permitir avaliar o grau de imunidade e a eficiência do processo vacinal. Todas estas razões obrigam a que os resultados

obtidos na reação de inibição da hemaglutinação possam ser aceitos com elevado grau de confiança.

As fontes de erro que, normalmente, se encontram associadas à dosagem de anticorpos inibidores da hemaglutinação, resultam da ocorrência, no soro humano, de inibidores inespecíficos da hemaglutinação e as técnicas utilizadas para sua remoção, nem sempre, atuam de modo eficiente. Em geral recorre-se à remoção pelo caolin<sup>21</sup>, pela mistura heparina-MnCl<sub>2</sub><sup>10</sup>, ou pelo sulfato de dextrano e cloreto de cálcio<sup>13</sup>.

O método que utiliza a heparina e o MnCl<sub>2</sub> foi selecionado pelo CDC para remoção dos inibidores na técnica padronizada da reação de inibição da hemaglutinação para o vírus da rubéola e foi o utilizado em nossa técnica modificada. As diferenças entre a técnica simplificada ICB, e a técnica padrão CDC são, como pode ver-se na Tabela 1, de ordem operacional, respeitando-se a proporção e natureza dos reagentes utilizados nesta última. Enquanto na técnica CDC existem 6 operações, na técnica ICB o número de operações é reduzido para 3, sem prejuízo dos resultados e com a vantagem de poder aumentar-se o número de reações a executar, uma vez que pode usar-se uma centrífuga não-refrigerada — Modelo V, Internacional, Rotor 250, com capacidade para 128 amostras, por vez; o número de amostras que pode ser processado, de cada vez, na centrífuga refrigerada — Modelo RC2, Sorvall, Rotor SM24, é de 24. Na técnica CDC a absorção das aglutininas naturais para hemácias de pinto, existentes no soro humano, é feita com uma suspensão de hemácias a 50% e, frequentemente, os controles de soro mostram, na leitura final da reação, aglutinação inespecífica, que tem de ser eliminada com nova absorção; na técnica ICB, o uso de papa de hemácias levou a resultados em que não era necessária absorção posterior.

A distribuição dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação, apresentada na Tabela 2, permite calcular as percenta-

gens de positividade ( $\geq 8$ ) obtidas com ambas as técnicas, sendo os valores de 90,1% para a técnica CDC e 90,5% para a técnica ICB, bastante próximos. Foi verificada uma associação ( $X^2_{obs.} = 55,49$ ) a um nível de significância de 5% ( $X^2_{crit.} \alpha = 5\%$ , g.l. = 36). Utilizando o método Kappa, proposto por Cohen e col.<sup>9</sup>, a concordância entre os dois métodos foi de  $0,5199 \cong 0,52$ , significativamente diferente de 0 (zero), mostrando que a concordância não é simplesmente casual. Verifica-se ainda, nessa Tabela, que dois casos, dados como negativos, pela técnica CDC, surgem com títulos de 16 e 32, quando testados pela técnica ICB e que um caso negativo por esta última técnica, tem título 8, na técnica CDC. Considerando estes resultados como decisórios quanto à necessidade de se fazer a vacinação, só os casos que pela técnica ICB têm títulos de 16 e 32, não seriam vacinados. Se analisarmos na Tabela 3 o número de eventos concordantes por ambas as técnicas pode calcular-se tanto a sensibilidade, como a especificidade da técnica ICB em relação à técnica CDC, obtendo-se respectivamente os valores de 99,4% e 90,0%. No presente estudo, sensibilidade é a capacidade da técnica usada dar um resultado positivo, quando o indivíduo estudado tem realmente imunidade para a rubéola pela técnica padrão; especificidade é a capacidade da técnica usada dar um resultado negativo quando o indivíduo estudado não possui imunidade. No que respeita à especificidade, nossos resultados acusam 2 casos que, pela técnica ICB não seriam vacinados, por terem sido dados como possuidores de imunidade. Considerando que, nas populações continentais, em média, 75% das mulheres no período da puberdade, possuem anticorpos inibidores da hemaglutinação para a rubéola, um levantamento sorológico em ampla escala feito pela técnica ICB deixaria de detectar a ausência de imunidade e, portanto, a necessidade de vacinação de 2 mulheres (2,5) em cada 100 mulheres examinadas.

Das observações feitas parece razoável sugerir a utilização da técnica simplificada em levantamentos sorológicos para a rubéola em larga escala, uma vez que, pela

redução do número de operações, existe uma ponderável economia material e de tempo dispendido na execução da reação.

RSPUB9/438

CANDEIAS, J. A. N. et al. [Rubella hemagglutination-inhibition test — A simplified technique.] *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 12:516-22, 1978.

ABSTRACT: A hemagglutination-inhibition test for rubella is described. In comparing the results obtained using this technique and the CDC standard rubella hemagglutination-inhibition test, the sensitivity and specificity indexes were, respectively, 99.4% and 90.0%. This technique should simplify mass screening of populations for immunity to rubella.

UNITERMS: Rubella virus. Hemagglutination-inhibition test.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BROWN, G. C. et al. Rubella antibodies in human serum: detection by the indirect fluorescent antibody technique. *Science*, 145:943-4, 1964.
2. CANDEIAS, J. A. N. & ROSENBERG, C. P. Inquérito sorológico para rubéola em professoras do Município de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 8:391-8, 1974.
3. CANDEIAS, J. A. N. et al. Resposta sorológica de adultos à vacinação contra a rubéola. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 11:345-52, 1977.
4. CARVALHO, R. P. de S. et al. Anticorpos para os vírus da rubéola, do sarampo e da caxumba em crianças de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 10:279-84, 1976.
5. CENTER FOR DISEASES CONTROL. *Standard rubella hemagglutination inhibition test*. Atlanta, GA, 1970.
6. CHIN, J. et al. The need for routine rubella antibody testing of women. *Calif. Med.*, 116:9-13, 1972.
7. CHUTE, A. L. *Foreword of International Rubella Conference on Protection for the Postpubertal Female*, Toronto, 1971. *Canad. J. publ. Hlth*, 62 (monogr. suppl.): v-vi, Sept. 1971.
8. CLARKE, M. et al. The use of single-radial-haemolysis for rubella antibody studies. *J. Hyg.*, Camb., 79:355-64, 1977.
9. COHEN, J. A. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psych. measur.*, 20:37-46, 1960.
10. COOPER, L. Z. et al. Experience with a modified rubella hemagglutination inhibition antibody test. *J. Amer. med. Ass.*, 207:89-93, 1969.
11. KLOCK, L. E. & RACHELEFSKY, G. S. Failure of rubella herd immunity during an epidemic. *New Engl. J. Med.*, 288:69-72, 1973.
12. LENNETTE, E. et al. The hemagglutination inhibition test for rubella: a comparison of its sensitivity to that of neutralization, complement fixation and fluorescent antibody tests for diagnosis of infection and determination of immunity status. *J. Immunol.*, 99: 785-93, 1967.
13. LIEBHABER, H. Measurement of rubella antibody by hemagglutination inhibition. II. Characteristics of an improved HAI test employing a new method for the removal of non-immunoglobulin HA inhibitors from serum. *J. Immunol.*, 104:826-34, 1970.

14. PARKMAN, P. D. et al. Recovery of rubella virus from army recruits. *Proc. Soc. exp. Biol.*, New York, 111: 225-9, 1962.
15. PARKMAN, P. D. et al. Studies of rubella. II. Neutralization of the virus. *J. Immunol.*, 93:608-17, 1964.
16. RACHELEFSKY, G. S. & HERRMAN, K. L. Congenital rubella surveillance following epidemic rubella in a partially vaccinated community. *J. Pediatr.*, 84:474-8, 1974.
17. RIZZATO, A. B. P. *Inquérito sorológico para rubéola em escolares do sexo feminino do distrito sede de Botucatu (SP) em 1973*. Botucatu, 1973. [Tese — Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu]
18. SAYLOR, L. F. Laboratory diagnostic services for rubella in public health in California. *Calif. Med.*, 111:62-4, 1969.
19. SCHMID, N. J. & LENNETTE, E. H. Rubella complement-fixing antigens derived from the fluid and cellular phases of infected BHK-21 cells: extraction of cell associated antigen with alkaline buffers. *J. Immunol.*, 97: 815-21, 1966.
20. SEVER, J. L. et al. Rubella complement fixation test. *Science*, 148:385-8, 1965.
21. STEWART, G. C. et al. Rubella-virus hemagglutination-inhibition test. *New Engl. J. Med.*, 276:554-7, 1967.
22. VECHIO, T. J. Predictive value of a single diagnostic test in unselected populations. *New Engl. J. Med.*, 274: 1171-3, 1966.
23. VERONESI, R. et al. Resultados do primeiro inquérito sorológico da rubéola entre 100 crianças de uma creche de São Paulo. *Bol. epidem.*, Rio de Janeiro, 1:89-93, 1969.
24. VERONESI, R. et al. Rubéola em São Paulo: inquérito sorológico em 349 indivíduos. Avaliação clínico-sorológica de dois tipos de vacinas de vírus atenuados. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*, 26:65-8, 1971.
25. VOLLER, A. & BIDWELL, D. E. A simple method for detecting antibodies to rubella. *Brit. J. exp. Path.*, 56: 338-9, 1975.
26. WEIBEL, R. E. et al. Influence of age on clinical response to HPV-77 duck rubella vaccine. *J. Amer. med. Ass.*, 222:805-7, 1972.
27. ZIRING, P. et al. The diagnostic of rubella. *Pediat. Clin. N. Amer.*, 18: 87-97, 1971.

Recebido para publicação em 04/08/1978

Aprovado para publicação em 09/08/1978