

ESTUDO SOBRE ANTICORPOS HETERÓFILOS DESENVOLVIDOS NA MONONUCLEOSE INFECCIOSA*

Adelaide José VAZ**
Eide Dias CAMARGO**
Maria Luiza ALDRIGUI**
Marcos Vinicius da SILVA***
Ana Maria Carvalho de SOUZA**
Mirthes UEDA**

RIALA 6/632

VAZ, A.J.; CAMARGO, E.D.; ALDRIGUI, M.L.; SILVA, M.V.; SOUZA, A.M.C.
& UEDA, M. — Estudo sobre anticorpos heterófilos desenvolvidos na mononucleose
infecciosa. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2): 97-102, 1987.

RESUMO: Na mononucleose infecciosa (MI), o Epstein Barr virus induz a formação de anticorpos heterófilos. A dosagem desses anticorpos é considerada como um importante critério diagnóstico. Foram estudados 143 soros de pacientes com suspeita de MI, utilizando as técnicas de Paul-Bunnell-Davidsohn (PBD), teste de lágrima (TL) e hemolisina de boi (HB), previamente padronizadas. Foi introduzido o extrato de fígado de cobaia como antígeno, avaliando sua eficiência na absorção diferencial dos anticorpos heterófilos tipo PBD. Dos 143 soros estudados, 64 (45%), 80 (56%), 35 (24%) apresentaram títulos significativos, respectivamente nos testes de PBD, TL e HB. Na diferenciação dos anticorpos heterófilos PBD, realizada através da absorção com os três antígenos, rim de cobaia (R), fígado de cobaia (F) e estroma de boi (E), foram observados respectivamente 77%, 70%, e 58% apresentando resultados significativos para MI. O estudo estatístico dos resultados pelo teste Q de Cochran demonstrou que os três testes utilizados detectaram anticorpos heterófilos diferentes ($\chi^2 = 46,6$; $\chi^2_{5\%} = 5,99$), bem como, que os antígenos R e F podem ser utilizados indistintamente na absorção diferencial dos anticorpos heterófilos da MI ($\chi^2 = 1,33$; $\chi^2_{5\%} = 3,84$). Os resultados apresentados ressaltam a importância da utilização de mais de um teste na pesquisa de anticorpos heterófilos no diagnóstico da MI.

DESCRIPTORIOS: mononucleose infecciosa; anticorpos heterófilos na mononucleose infecciosa.

INTRODUÇÃO

No decurso da infecção por vírus Epstein Barr (EBV) há indução de grande variedade de anticorpos. Os principais são os anticorpos específicos contra diferentes antígenos do EBV e anticorpos heterófilos para eritrócitos de carneiro, cavalo e boi.

A dosagem de anticorpos heterófilos na mononucleose infecciosa tem sido considerada como um dos critérios diagnósticos.

A avaliação dos anticorpos heterófilos na mononucleose (MI) foi realizada pela primeira vez por PAUL & BUNNELL¹⁶ em 1932. Esses autores efetuaram a dosagem de aglutininas heterófilas anti-eritrócitos de carneiro, baseados nos dados dos trabalhos de DAVIDSOHN^{4,6} e DAVIDSOHN & RAMSDELL⁵ sobre a ocorrência de anticorpos desta natureza na doença do soro.

O teste de Paul-Bunnell (realizado com eritrócitos de carneiro) efetuava uma simples dosagem aglutinínica anti-eritrócitos de carneiro. Mais tar-

* Realizado na Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Instituto Adolfo Lutz e do Hospital Emílio Ribas, São Paulo, SP.

de, foi padronizada uma técnica que permitiu distinguir as aglutininas para hemácias de carneiro, desenvolvidas na MI, das que ocorrem na doença do soro e em outras condições como hepatite, tuberculose, leucemia aguda, leucemia monocítica, doença de Hodgkin, nefrite crônica etc^{7,8,10}. Este teste tem sido conhecido como teste diferencial de Paul-Bunnell-Davidsohn.

Em 1935, BAILEY & RAFFEL² relataram a ocorrência de anticorpos anti-hemácia de boi na mononucleose infecciosa mas, somente em 1951, MASON¹⁵ padronizou o teste de hemolisina para hemácias de boi. Este teste foi introduzido no diagnóstico laboratorial por ser bastante sensível e específico.¹⁵

HOFF & BAUER¹³ descreveram um teste rápido e simples para a MI (monoteste) utilizando suspensão de eritrócitos de cavalo formolizados como antígeno. STUART et alii¹⁸, em 1936, já haviam relatado que os soros dos pacientes com MI aglutinavam eritrócitos de cavalo. No mesmo ano, BEER³ recomendou a utilização do teste de aglutinina para células de cavalo no soro, antes e após absorção com eritrócitos bovinos. DAV- IDSOHN¹¹, baseado nos estudos de HOFF & BAUER¹³, desenvolveu um teste rápido e simples para MI, empregando hemácias de cavalo, e estabeleceu ser este teste bastante específico. Estudos posteriores de LEE et alii¹⁴ conduziram à padronização do *spot-test*; estes autores concluíram que as hemácias de cavalo são mais sensíveis do que os eritrócitos de carneiro no diagnóstico da MI, possibilitando a detecção de níveis baixos de anticorpos, principalmente na fase inicial da doença. A técnica de absorção prévia do soro com extrato de rim de cobaia e estroma de hemácia bovina permite uma diferenciação indireta entre soros positivos e negativos para MI.

O objetivo deste trabalho foi estudar comparativamente três testes sorológicos para detecção de anticorpos heterófilos, reação de PBD (hemácia de carneiro), teste de lágrima (hemácia de cavalo), hemolisina de boi (hemácia de boi), e também investigar o comportamento do fígado de cobaia como antígeno de absorção na reação de PBD, já que apresenta, como o rim, alto conteúdo de antígenos heterófilos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Soros

Foram estudadas amostras únicas de soro de 143 indivíduos encaminhados pelo Hospital Emílio Ribas e Centros de Saúde da rede estadual de São Paulo, com suspeita clínica de mononucleose infecciosa. Os soros foram inativados a 56°C durante 30 minutos e conservados a -20°C até o momento do uso.

2. Soluções

Solução salina (NaCl 0,15 M); *solução VBD* (NaCl 0,143 M, Dietilbarbiturato de sódio 0,005 M, CaCl₂ 0,15 mM, MgCl₂ 0,5 mM, HCl 0,034 M - pH 7,4); *solução de B.R.K.** (NaCl 0,072 M; citrato de sódio 0,027 M, glicose 0,114 M - pH 6,1).

3. Antígenos e reagentes biológicos

Hemácias de carneiro: coletadas de três carneiros, em B.R.K., e estocadas a 4°C. As hemácias foram lavadas em solução salina e suspensas na mesma solução na concentração de 2% (v/v).

Hemácias de cavalo: coletadas em B.R.K., e estocadas a 4°C. Para o uso, as hemácias foram lavadas em solução salina e ressuspendidas a 2% em VBD, contendo 0,9% de leite desnatado**.

Hemácias de boi: coletadas em B.R.K. e estocadas a 4°C; as hemácias foram lavadas em solução salina e suspensas em VBD, na concentração de 1% (v/v).

Complemento: *pool* de soro de cobaias machos, foi liofilizado e estocado a 4°C. O lote de complemento foi testado, quanto à sua atividade complementar, pelo teste de hemolisina de hemácias de boi e ausência de atividade lítica das mesmas.

Extrato de rim de cobaia: rins coletados de cobaias machos e fêmeas, limpos, dos quais foi retirada a cápsula, lavados em solução salina e posteriormente homogeneizados em *Tissue Grinder****. O extrato homogeneizado foi lavado em solução salina e água destilada, alternadamente, por centrifugação. Após a obtenção da suspensão

* Solução de Bukantz, Rein & Kent.

** Molico^R.

*** Tissue grinder — Omni-Mixer Ivan Sorvall Inc., USA.

livre de hemoglobina, o sedimento foi tratado com acetona por quatro a cinco vezes. O sedimento final foi então dessecado a vácuo e pulverizado em gral. O rim pulverizado foi guardado em frascos herméticamente fechados e estocados a 4°C.

Extrato de fígado de cobaia: obtido como no procedimento descrito para o extrato de rim de cobaia.

Estroma de hemácias de boi: hemácias de boi foram lavadas e suspensas em solução salina na concentração final de 20%. Foram fervidas durante 60 minutos em banho-maria a 100°C, reconstituídas até o volume original com solução salina à qual se adicionou fenol na concentração final de 0,5% (p/v).

4. Testes sorológicos

Teste diferencial de Paul-Bunnell-Davidsohn: foram utilizados eritrócitos de carneiro como indicador da reação; foi realizado de acordo com a metodologia descrita anteriormente^{1,7,9}. Os soros com títulos superiores ou iguais a 1:56 na 1ª fase da reação foram tratados com três antígenos diferentes, separadamente: 40 mg de rim de cobaia, 60 mg de fígado de cobaia (adicionados a 1 ml de soro diluído a 1:5 em solução salina) e 0,8 ml de estroma de boi a 20% (adicionado a 0,2 ml de soro puro). As absorções foram realizadas por agitação durante 10 minutos, à temperatura ambiente, e centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos.

Teste de hemolisina para hemácias de boi: foi realizado de acordo com as recomendações do "Center for Diseases Control (CDC)"¹². Os soros foram diluídos a partir de 1:10 em razão 2 até 1:1.280, em placas de microtitulação de poliestireno de fundo em U, em volume final de 0,025 ml. A cada diluição adicionou-se 0,025 ml de suspensão de hemácias de boi a 1% e igual volume de complemento diluído a 1:15 em VBD. Após a agitação, as placas foram incubadas a 37°C (banho-maria) por 30 minutos. A hemólise de 50% foi tomada como ponto final da reação, comparando-se com os padrões de lise realizados em paralelo. Títulos superiores ou iguais a 1:40 foram considerados significativos.

Teste de lágrima (tear-drop): foi realizado de acordo com EVANS et alii¹², modificado: diluições seriadas do soro absorvido com rim de cobaia com títulos variando de 1:10 a 1:2560, em VBD, foram feitas em placas de microtitulação de 96 cavidades, de fundo em V, no volume final de 0,050 ml; igual volume de suspensão de eritrócitos de cavalo foi adicionado a cada cavidade e a placa foi incubada a 37°C, por 2 horas, em banho-maria. A leitura da aglutinação foi feita colocan-

do-se a placa em posição vertical até a célula controle formar gota de lágrima. A maior diluição do soro que aglutinou as hemácias (ausência de lágrima) foi considerada como ponto final da reação. O *cut off* do teste foi considerado como 1:40.

Análise Estatística

A eficiência dos três testes aplicados aos soros foi analisada estatisticamente pelo teste *Q* de Cochran para três amostras relacionadas¹⁷. Também foi utilizado o teste de McNemar¹⁷ para comparação dos testes dois a dois. Esse teste foi utilizado para verificação do comportamento dos antígenos de rim e fígado de cobaia quanto à absorção de anticorpos heterófilos, no diagnóstico da mononucleose infecciosa.

RESULTADOS

Na tabela 1 é apresentada a distribuição etária e por sexo da população estudada e, na tabela 2, os resultados dos 143 soros ensaiados pelos testes sorológicos.

TABELA 1

Distribuição por sexo e idade dos 143 pacientes com suspeita de mononucleose infecciosa

Idade \ Sexo	Masculino		Feminino		Total	
	N	%	N	%	N	%
0 - 10	28	19,6	20	14,0	48	33,6
10 - 20	19	13,3	16	11,1	35	24,4
20 - 30	9	6,3	19	13,3	28	19,6
30 - 40	3	2,1	5	3,5	8	5,6
40 - 50	2	1,4	1	0,7	3	2,1
50 - 72	1	0,7	1	0,7	2	1,4
ignorada	8	5,6	11	7,7	19	13,3
Total	70	49,0	73	51,0	143	100,0

No teste diferencial dos 64 soros com títulos superiores ou iguais a 1:56 na reação de PB, foram realizadas três absorções: antígenos de rim de cobaia, fígado de cobaia e de estroma de hemácias bovinas, sendo calculada a porcentagem de absorção para cada antígeno (tabela 3).

Os resultados dos três testes foram classificados como significativos ou não significativos para MI, e foram comparados entre si (tabela 4).

TABELA 2

Distribuição dos 143 soros de pacientes com suspeita de mononucleose infecciosa, segundo teste sorológico e título obtido

Teste	Título	≤ 56	56	112	224	448	890	1792	3584	Total
	Paul-Bunnell		79	31	18	06	06	—	03	—
Teste	Título	≤ 40	40	80	160	320	640	1280	2560	Total
	Teste de lágrima	63	41	16	07	08	02	04	02	143
Hemolisina de boi		108	10	10	09	02	03	01	—	143

TABELA 3

Distribuição dos 64 soros de pacientes com suspeita de mononucleose infecciosa com títulos significativos na 1ª fase da reação de Paul-Bunnell segundo antígeno utilizado na absorção diferencial e porcentagem (%) de absorção dos anticorpos heterófilos.

Antígeno	Porcentagem de absorção	TÍTULO						Total
		56	112	224	448	896	1792	
Rim da cobaia	50	2	3	—	—	—	—	5
	50 - 75	22	12	6	6	—	3	49
	75	7	3	—	—	—	—	10
Fígado de cobaia	50	—	2	1	—	—	—	3
	50 - 75	19	12	5	6	—	3	45
	75	12	4	—	—	—	—	16
Estroma de hemácias bovinas	50	2	4	—	—	—	—	6
	50 - 75	18	2	1	—	—	—	21
	75	11	12	5	6	—	3	37

TABELA 4

Resultados comparativos entre os testes sorológicos

		Teste de hemolisina de boi					Teste de lágrima					Teste de hemolisina de boi		
		NS	S	T			NS	S	T			NS	S	T
Teste de Paul-Bunnell	NS	77	02	79	Teste de Paul-Bunnell	NS	46	33	79	Teste de Lágrima	NS	60	03	63
	S	31	33	64		S	17	47	64		S	48	32	80
	T	108	35	143		T	63	80	143		T	108	35	143

NS – Soros não significativos.

S – Soros significativos.

T – Total de soros.

DISCUSSÃO

A mononucleose infecciosa é mais freqüente em crianças e adolescentes¹². A distribuição dos 143 soros escolhidos para o estudo (tabela 1) mostra que não houve diferença significativa quanto ao sexo, e que 68% dos pacientes com suspeita de mononucleose tinham idade entre 3 meses e 19 anos.

Os índices de sensibilidade e especificidade encontrados por EVANS et alii¹² para os testes de Paul-Bunnell, lágrima e hemolisina de boi foram respectivamente de 81% e 88,0%; 96,0% e 93,3% e 85,0% e 100%. Os autores observaram, ainda, que os anticorpos heterófilos detectados contra hemácias de boi e de carneiro retornam ao normal em dois a três meses, mas que os anticorpos anti-hemácias de cavalo persistem por um ano ou mais em 75% dos casos. Nossos resultados (tabela 2) podem ser explicados pelas considerações anteriores. Estes, quando submetidos ao teste Q de Cochran, para comprovar se diferiam entre si, mostraram um χ^2 de 46,6 ($\chi^2_{2;5\%} = 5,99$), confirmando que os testes detectaram anticorpos heterófilos diferentes. A análise dois a dois dos testes também comprovou essas diferenças.

Com relação ao estudo do comportamento dos dois antígenos (tabela 3), o resultado ($\chi^2 = 1,33$; $\chi^2_{1;5\%} = 3,84$) demonstrou que os antígenos de rim e de fígado de cobaias podem ser utilizados indistintamente na absorção diferencial do teste de Paul-Bunnell-Davidsohn. Este achado contribui para o maior aproveitamento do material biológico disponível (cobaia).

Os índices de concordância entre os testes, obtidos a partir da tabela 4, foram: Paul-Bunnell e hemolisina de boi — 76,9%; Paul-Bunnell e teste de lágrima — 65,0%; hemolisina de boi e teste de lágrima — 64,3%. Estes baixos índices ressaltam a importância da utilização de mais de um dos testes sorológicos, para aumentar a confiabilidade da pesquisa de anticorpos heterófilos no diagnóstico da mononucleose infecciosa.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Clóvis de Araújo Peres, do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na análise estatística dos resultados.

VAZ, A.J.; CAMARGO, E.D.; ALDRIGHI, M.L.; SILVA, M.V.; SOUZA, A.M.C. & UEDA, M. — Study on heterophile antibodies in infectious mononucleosis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):97-102, 1987.

ABSTRACT: Heterophile antibodies, one of the serodiagnostic criteria for Epstein-Barr virus (EBV) infection responsible for infectious mononucleosis (IM) were determined in 143 sera from patients with clinical manifestations of IM which were tested by Paul-Bunnell-Davidsohn (PBD) test, tear drop test (TD) and hemolysin for bovine erythrocytes (HB). An alternative use of guinea-pig liver extract for differential absorption of PBD type antibody was compared with the conventional method employing guinea-pig kidney extract. From the 143 sera, 64 (45%), 80 (56%) and 35 (24%) showed significant titres in PBD, TD and HB tests, respectively. In the differentiation of PBD-antibodies made through absorption with three antigen extracts: guinea-pig kidney (K), guinea-pig liver (L) and bovine red-cell stroma, significant results were observed of 77%, 70% and 58%, respectively. The three tests detect different heterophile antibodies ($p < 0.05$) and the K and L antigens may be employed indistinctively in the differential absorption of heterophile antibodies in the IM ($p < 0.05$). The need of using more than one test for heterophile antibodies detection in IM serodiagnosis is stressed.

DESCRIPTORS: infectious mononucleosis; antibodies, heterophile, in infectious mononucleosis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARRET, A.M. — The serological diagnosis of glandular fever (infectious mononucleosis): a new technique. *J. Hyg., Cambridge*, 41: 330-43, 1941.
2. BAILEY, G.H. & RAFFEL, S. — Hemolytic antibodies for sheep and ox erythrocytes in infectious mononucleosis. *J. clin. Invest.*, 14:228-44, 1935.
3. BEER, P. — The heterophile antibodies in infectious mononucleosis and after infection of serum. *J. clin. Invest.*, 15:591-97, 1936.
4. DAVIDSOHN, I. — Heterophile antibodies in serum sickness. *J. Immunol.*, 16:259-73, 1929.
5. DAVIDSOHN, I. & RAMSDELL, S.G. — Horse serum as a heterophilic antigen. *J. Immunol.*, 17:365-75, 1929.
6. DAVIDSOHN, I. — Further studies on heterophilic antibodies in serum sickness. *J. Immunol.*, 18:31-49, 1930.
7. DAVIDSOHN, I. — Serological diagnosis of infectious mononucleosis. *J. amer. med. Assoc.*, 108: 289-95, 1937.
8. DAVIDSOHN, I. — Teste for infectious mononucleosis. *Am. J. clin. Pathol.* (tech. suppl.), 2:56-60, 1938.
9. DAVIDSOHN, I.; STERN, K. & KASHIWAGI, C. — Differential test for infectious mononucleosis. *Am. J. clin. pathol.*, 21:1101-13, 1951.
10. DAVIDSOHN, I. & LEE, C.L. — Serological diagnosis of infectious mononucleosis: I. Comparative study of five tests. *Am. J. clin. pathol.* 41:115-25, 1964.
11. DAVIDSOHN, R.J.L. — New slide test for infectious mononucleosis. *J. clin. Invest.*, 20:643-46, 1967.
12. EVANS, A.S.; NIEDERMAN, J.C.; CENABRE, L.C.; WEST, B. & RICHARDS, V.A. — A prospective evaluation of heterophile and Epstein-Barr Virus specific IgM antibody tests in clinical and subclinical infectious mononucleosis: specificity and sensitivity of the tests and persistence of antibody. *J. infect. Dis.*, 132:546-54, 1975.
13. HOFF, G. & BAUER, S. — A new rapid slide test for infectious mononucleosis. *J. am. med. Assoc.*, 194:351-53, 1965.
14. LEE, C.L.; DAVIDSOHN, I. & PANCZSZYN, O. — Horse agglutinins in infectious mononucleosis. II. The spot test. *Am. J. clin. Pathol.*, 49:12-18, 1968.
15. MASON, J.K. — An ox cell hemolysin test for the diagnosis of infectious mononucleosis. *J. Hyg., Cambridge*, 49:471-81, 1951.
16. PAUL, J.R. & BUNNELL, W.W. — The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. *Am. J. med. Sci.*, 183:90-104, 1932.
17. SIEGEL, S. — *Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento*, Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 1975. 350 p.
18. STUART, C.A.; GRIFFIN, A.M.; WHEELER, K.M. & BATTEY, S. — A thermostable antigen in beef cells. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 34:212-15, 1936.

Recebido para publicação em 17 de novembro de 1987.