DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
(Diretor: Prof. Dr. Lucas de Assumpção)

PESQUISA DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA O VIRUS DA GRIPE EPIDÊMICA HUMANA TIPO B (LEE), EM PESSOAS NORMAIS, NA CIDADE DE SÃO PAULO (*)

LUCAS DE ASSUMPÇÃO

Faz já treze anos que o primeiro virus da gripe humana foi isolado por **Smith, Andrews e Laidlaw** (1933). (1) Este virus foi originalmente denominado "virus da influenza" ou "virus da influenza humana", depois "virus da influenza epidêmica" e por fim "virus Tipo A", responsavel pela influenza ou gripe A.

Pesquisas feitas em diversas partes do mundo vieram confirmar essa primeira descoberta, mas logo se verificou não ser esse virus o agente etiológico de todas as infecções do aparelho respiratório diagnosticadas como gripe, nem de todas as suas epidemias.

Em algumas delas não foi isolado esse virus, e os convalescentes não apresentavam aumento de anticorpos para ele — como geralmente se verifica — embora clinicamente os casos fossem indistinguiveis daqueles apresentados nos surtos epidêmicos produzidos pelo virus A.

Era de se esperar, portanto, que outros agentes, ainda indeterminados, fossem capazes de produzir essa infecção.

Em epidemia de doença semelhante à gripe, ocorrida em Irvington sobre o Hudson, **Francis** (1940, (2) isolou um virus de um doente (Lee), após sucessivas passagens de lavagem de garganta em furões e depois em camundongos.

Francis fez diversas pesquisas com este virus e verificou que o sôro de convalescente desta epidemia apresentava aumento de anticorpos neutralizantes para a raça isolada **(Lee)**; ao passo que não era constatado êsse aumento para o virus PR-8 da gripe epidêmica, virus este, Tipo A. Fez ainda experiências com o sôro de furões submetidos a esse virus, pesquisando anticorpos na fase aguda e na convalescença, em provas de proteção, com 100 e 1000 doses mortais da raça PR-8 (virus A), não constatando o seu aumento. De outro lado, a quasi ausência de anticorpos para o virus isolado (Lee) no sôro dos doentes da epidemia, no momento da infecção, assim como aumento específico para esse virus na convalescença, independendo dos anticorpos para PR-8 — virus da gripe epidêmica Tipo A

(*) **Trabalho apresentado à Associação Paulista de Medicina (Secção de Higiene e Medicina Tropical), em 6 de novembro de 1946.**
Recebido para publicação em 18 de julho de 1947.

— tornou evidente que este virus da gripe epidêmica não estava envolvido na epidemia, e que a nova fonte de virus — virus Lee — representava outra entidade sorológica independente.

De acordo com a classificação sugerida por **Horsfall, Lennette, Rickard, et al.** (1940), ([3]) na qual o primeiro virus isolado da gripe epidêmica por **Smith, Andrewes** e **Laidlaw** foi denominado virus A, agente da gripe A, se outros virus da gripe fossem isolados deveriam ser designados virus B. virus C, etc., correspondendo à influenza ou gripe B, C, etc. Assim, as epidemias causadas por virus do tipo Lee são designadas "gripe B", sendo o virus Lee classificado como Tipo B.

Donde se conclui que a gripe A e a gripe B são etiologicamente diferentes, a-pezar-de se tratar de doenças clinicamente iguais.

Independentemente e na mesma ocasião em que Francis fazia seus estudos com o virus Lee da gripe, **Magill** (1940) ([4]) observou dois casos de infecção semelhantes à gripe entre trabalhadores de laboratório. A inoculação intranasal de lavagem da garganta em furões e depois em camundongos suiços, revelou que, sob o ponto de vista da ação patogênica, os animais se comportavam de maneira idêntica ao do virus da gripe epidêmica. Mas as provas imunológicas demonstraram que o sôro dos pacientes não apresentava aumento de anticorpos para a raça PR-8, nas verificações feitas com o sôro na fase aguda e na convalescença; no entanto, para o próprio virus isolado, o sôro revelava significativo aumento. Verificou **Magill** a filtrabilidade desse virus em **Berkefeld.** E assim ficou demonstrado que o virus isolado se diferenciava do PR-8 pelas suas propriedades antigênicas.

Estas pesquisas de **Magill,** feitas independentemente e na mesma ocasião das de **Francis,** deixaram afirmada a existência do virus B da gripe, agente etiológico da gripe B. Embora clinicamente não se possa distinguir a gripe A da gripe B, não há, porem, imunidade cruzada entre elas, por serem imunologicamente distintas, correspondendo a agentes etiológicos antigenicamente diferentes.

Entre as diversas amostras ou cepas de virus A isoladas, existem diferenças antigênicas quantitativas, como foi assinalado em 1936 por **Magill e Francis** ([6]) fazendo provas de neutralização com sôro imune específico. Estas observações foram ulteriormente confirmadas com maior número de raças de virus da influenza do Tipo A, por **Stuart-Harris** et al., ([6]) **Magill e Francis,** ([7]) **Smith** e **Andrewes** ([8]) e **Hirst,** ([9]) tendo o último feito estudo sobre as diferenças antigênicas entre raças da gripe A pelo processo das hemoaglutininas.

Das diversas pesquisas orientadas nesse sentido, ficou demonstrado: a) que existem diferenças entre as raças Tipo A isoladas; b) que as raças que mais se assemelham são as isoladas da mesma epidemia; c) que elas tambem se diferenciam na passagem em animais, umas se adatando rapidamente ao furão (como as oriundas de Porto Rico), e outras com mais dificuldade (como as de Filadelfia); d) que as raças de virus da gripe A apresentam numerosos componentes antigênicos, os quais se agrupam em

forma de mosaico, em proporções diferentes para cada raça, mas não estando todos presentes em cada uma delas.

Com a descoberta do virus Tipo B, verificou-se que sob o ponto-de-vista imunológico ele diferia do virus Tipo A, um não produzindo anticorpos contra o outro; a imunidade para um, não conferia resistência ao outro. Mas entre as raças do Tipo A, há imunidade cruzada, embora apresentem pequenas diferenças quantitativas.

Após o isolamento de diversas cepas de virus do Tipo B, foi-se verificando fato idêntico ao que estamos assinalando com o virus do Tipo A.

Em 1941, **Eaton** e **Beck**, ([10]) durante uma epidemia de gripe na California, isolaram um virus em furão, que puderam identificar pelas provas de neutralização cruzadas como sendo Tipo B. Verificaram, contudo, que essa fonte (Montgomery) adatou-se com grandes dificuldades ao furão e depois ao camundongo, e que não era idêntica, na sua composição antigênica, à raça Lee (Tipo B), isolada por **Francis**, mas intimamente relacionada com ela.

Irving Gordon (1942) ([11]) descreveu o isolamento e a identificação de nova cepa de virus Tipo B, demonstrando que tanto nas provas de neutralização feitas em camundongos, como **in vitro**, ela era qualitativamente semelhante, mas quantitativamente diferente das raças Tipo B Lee, de **Francis**, e T M, de **Magill**. Confirmou ainda — como previamente já tinha sido observado — a maior dificuldade de adatação a animais dos virus Tipo B, o que se deu tambem com a raça por ele isolada (572). E o estudo comparativo entre as três cepas de virus Tipo B (Lee, T M e 572) revelou diferenças antigênicas quantitativas entre todas elas. A raça Lee mostrou-se possuidora de mais ampla constituição antigênica, o que a torna mais representativa do tipo para estudos imunológicos.

O comportamento do virus B em animais é idêntico ao do virus A, mostrando-se ambos infecciosos para o furão, hamster, camundongo e embrião de pinto, e com o mesmo tropismo. Quantitativamente, a ação patogênica para animais de experiência é mais acentuada com o virus A.

Experiências em seres humanos tambem têm sido feitas com o virus da gripe Tipo B, revelando dados interessantes. **Francis, Pearson, et al.** (1944) ([12]) tomaram um grupo de pessoas, submetendo-as a pulverizações nasais com o virus da gripe B. Após um período de 12 a 24 horas apareceram os sintomas clínicos da gripe, embora tivessem os pacientes revelado insignificantes sintomas respiratórios. Em quatro dos pacientes a doença foi suficientemente severa, forçando-os a irem para a cama. Quasi todos apresentaram anticorpos aumentados no mínimo quatro vezes, na convalescença, para o virus B.

Ainda este ano, **W. Henle et al. (1946,** ([13]) fizeram experiências semelhantes promovendo a transmissão da gripe a seres humanos (mais de 200) com três raças de virus A (PR-8, F-12 e F-99) e com uma do virus B (Lee). Todas as quatro fontes produziram manifestações clínicas semelhantes. Com as raças PR-8 e Lee o período de incubação foi mais curto (24 horas), e geralmente maior com o virus F 99 (30 a 48 horas). Na

maior parte dos pacientes houve produção de anticorpos homólogos, isto é, aumento de imunecorpos anti-virus A após inalação dos virus A, assim como aumento para o virus B quando este era inoculado. Alguns deixaram de apresentar anticorpos, mesmo tendo tido alta temperatura no decorrer da infecção; sendo ainda de grande significação o fato observado de certos pacientes apresentarem conjuntamente a produção de anticorpos heterólogos, ou independentemente do aumento de anticorpos homólogos.

Fizeram os pesquisadores acima interessantes comentários a esses fatos imunológicos, comparando-os com o que se observa em algumas epidemias Nas epidemias de gripe é fato conhecido que na sua grande maioria os atingidos apresentam aumento de anticorpos para um tipo de virus — que seria o responsavel pela epidemia — mas alguns tambem revelam aumento de anticorpos para o outro tipo, ou para ambos os tipos A e B, ou, ainda, não apresentam para nenhum dêles. Admite-se, nestes casos — e é o que às vezes acontece — que na mesma epidemia, por ex. de gripe A, apresentem-se casos de gripe B e outros que, não revelando anticorpos para esses dois virus, pertenceriam a tipos ainda desconhecidos ("gripe Y" — "gripe X"). Lembram que ainda outra interpretação poderia ser examinada, como por ex. a de admitir a possibilidade de tratar-se muitas vezes de reação anamnéstica.

Portanto, a síndrome clínica que caracteriza a gripe não apresenta uma etiologia unívoca. Mesmo em dada epidemia — como acabamos de ver — pode apresentar-se mais de uma variedade etiológica de gripe. Geralmente se observa que maior número de casos são infectados pelo virus A ou pelo B, ficando número variavel (mais ou menos 30%) em que não é possivel evidenciar a infecção para qualquer desses virus. Estes casos não podem ser distinguidos clinicamente daqueles em que se consegue determinar a etiologia; e as lavagens de garganta desses doentes, quando inoculadas em furões ou hamsters, não promovem o aparecimento de anticorpos para os virus conhecidos da gripe, o que demonstra não serem eles responsaveis pela infecção.

A hipótese de se tratar da existência, no mínimo, de mais um virus na etiologia da gripe, antigenicamente diferente dos virus A e B, é ainda reforçada pelo fato de que o material (lavagens de garganta), passado para furões, produz em certos casos sinais respiratórios semelhantes aos causados pelos virus isolados da gripe.

A coexistência das gripes A, B e da produzida por virus desconhecido, assim como a maior ou menor incidência de cada uma dependerá de numerosos fatores, entre os quais a facilidade da distribuição do agente etiológico e do número de pessoas suscetíveis (não imunes) a cada um desses virus.

Tambem é interessante assinalar que nas epidemias de gripe tem sido possivel isolar de um mesmo caso os dois virus A e B.

Fatos semelhantes aos apresentados na epidemiologia da gripe têm sido observados com outros virus. Sugerem os trabalhos de **Hammon** e **Howitt** (14) (1942) e **Hammon** (15) (1943) que dois virus teriam sido responsaveis pelas epidemias de encefalite em **Yakima Valley**, no verão de

1940, e em **Yakima Valley** e no **Arizona**, em 1941. Nessas epidemias os virus W E E (western equine encephalitis) e o S. Luiz da encefalite foram evidenciados em cada uma delas, e algumas vezes em um mesmo doente.

Pesquisas recentes de **Sharp, Taylor et. al. (1944)** ([16]) assinalam diferenças na forma e tamanho entre os virus A e B. Estudando-os em micrografias electrônicas, verificaram que o virus A se apresenta em partículas com a forma de feijão ou de rim, ao passo que as partículas do virus B (Lee), mais sob a forma de corpos esféricos. Quanto ao tamanho, verificaram que o virus A mede 80 mμ e o virus B 99,9 mμ, de diâmetro.

O comportamento epidemiológico da gripe B ainda não está bem estudado, embora já se conheçam fatos interessantes.

Algumas vezes surgem pequenas mas agudas epidemias, semelhantes às da gripe A, como foram as duas primeiras epidemias identificadas como produzidas pela gripe B em 1936 e 1940: esta pelo primeiro isolamento do virus B por **Francis** (loc. cit.) e a outra, mais tarde, pelas provas imunológicas com soros guardados. Mas desde 1940 que se tem observado de fato que a gripe B pode ocorrer de maneira diversa durante o período do ano em que surgem doenças respiratórias, ora intercalada com a gripe A, ora independendo dela.

Mesmo na América do Sul, na República Argentina, **Sordelli, Taylor** e **Parodi** ([17]) estudando uma epidemia de gripe lá ocorrida em 1940, concluiram estarem presentes os virus A e B da gripe na Argentina durante o inverno de 1940. O virus A teria sido o principal agente da epidemia aguda do mês de julho; ao passo que o virus B estaria distribuido durante um período maior.

Um dos assuntos que merecem atenção é o da periodicidade da gripe.

Em trabalho publicado ainda este ano pela "The Commission on Acute Respiratory Diseases, Fort Bragg, North Carolina", ([18]) foram estudadas 16 epidemias de gripe observadas entre 1920 e 1944 nos Estados Unidos. Verificou a Comissão que a gripe A parece ter um ciclo de 2 a 3 anos, ao passo que a gripe B, de 4 a 5 anos. Sugeriu que o balanço entre pessoas imunes e suscetíveis na população seria um fator predominante que determinaria a ocorrência dessas epidemias. Apresentou ainda essa Comissão quatro pontos que merecem discussão no estudo epidemiológico da gripe: (a) o número de diferentes agentes etiológicos dessas epidemias; (b) a possibilidade de evitar futuras epidemias; (c) o problema da sobrevivência dos virus entre as epidemias; e (d) o mecanismo que determina a sua periodicidade.

A imunidade na gripe tem sido encarada de maneira diferente depois que se isolou o seu virus.

Afirmava-se que não existia imunidade na gripe ou que ela era de pouca duração. E até se chegou a admitir que essa infecção não conferia imunidade ao indivíduo, tornando-o, pelo contrário, de maior suscetibilidade a contágios subsequentes.

As provas de pesquisas de anticorpos tanto nos infectados como nos vacinados vieram demonstrar que existe a imunidade na gripe.

E' sabido que a síndrome que caracterisa a gripe é comum a diversas infecções que se parecem, clínica e epidemiologicamente. Contudo, os conhecimentos atuais proporcionados pelas provas sorológicas podem demonstrar tratar-se de moléstias muito diferentes. E mesmo o fato conhecido de a gripe verificar-se com maior assiduidade na infância, sugere aumento de resistência após esse período; aumento de resistência que faz tambem com que nem todos os indivíduos expostos ao mesmo contágio em uma epidemia adquiram a gripe.

O virus da gripe humana é altamente antigênico, e tanto na infecção natural como na experimental em animais suscetiveis ou não, promovem grande resposta antigênica específica.

No estudo da imunidade na gripe humana verifica-se que o sôro adquire propriedades neutralizantes após cada vez que o homem é por ela atingido, respondendo os anticorpos especificamente aos componentes antigênicos dos virus A e B. Como estes virus apresentam antígenos diferentes, não há entre eles imunidade cruzada. Daí a grande importância da pesquisa de anticorpos, principalmente dos neutralizantes, cujas provas poderão dissociar casos de gripe epidêmica do mozaico de outras infecções respiratórias e similares.

O sôro de recem-nascidos contém anticorpos para os virus humano e suino da gripe a título mais ou menos igual ao dos adultos. Estes anticorpos desaparecem após alguns meses por se tratar de imunidade passiva conferida pela mãe. Na idade de três meses já quasi não estão presentes, o mesmo se observando nos primeiros anos, em que a presença rara de anticorpos para os virus da gripe indicará infecção recente; como tambem não há anticorpo para o virus da gripe suina nas crianças e adolescentes com menos de 15 anos.

A maior parte dos soros humanos neutralizam o virus da gripe humana, como também a maioria dos soros de adultos neutralizam o virus da influenza ou da gripe suina.

Na convalescença é que se dá o maior desenvolvimento de anticorpos. Também apresentam aumento de anticorpos as pessoas que estão em contacto com doentes de gripe, embora não revelem sintomas de infecção. E ainda: nas imunizações ativas, feitas com as modernas vacinas preparadas com o virus cultivado no líquido alantóico de embrião de galinha, há franco desenvolvimento de anticorpos, cujo doseamento serve para julgar do valor antigênico da vacina.

Na infecção gripal, principalmente no seu início, os anticorpos pouco se desenvolvem, permanecendo o título mais ou menos igual aos dos soros normais. Estes neutralizam o virus, em provas de proteção, geralmente nas diluições a 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 até 1:32; mas na convalescença os títulos são comumente três vezes maiores, passando o sôro a neutralizar nas diluições de 1:80, 1:100, 1:320, 1:640, etc. Dez a vinte meses após, os anticorpos retornam ao seu título normal.

A presença de anticorpos para os virus A e B da gripe refletem relações passadas com esses virus.

A determinação periódica de anticorpos é de grande importância porque nos fornecerá um índice da gripe no lugar, indicando ainda aumento ou diminuição da imunidade da população.

Portanto, o nivel de anticorpos de uma população não só revela as últimas epidemias de gripe, como também a iminência de novo surto.

A pesquisa de anticorpos na gripe tem grande valor, servindo principalmente para: (a) identificação dos virus; (b) estudos epidemiológicos; (c) diagnósticos retrospectivos; (d) diagnósticos etiológicos baseados nas alterações imunológicas no doente do período agudo para o da convalescença e (e) estabelecer a duração da imunidade.

Os anticorpos podem ser pesquisados pelos seguintes processos: 1) pela prova de proteção em animais; 2) pela fixação do complemento; 3) por testes de absorção de anticorpos; 4) pela reação antígeno-anticorpo nas culturas de tecidos; 5) pela floculação; e 6) pela inibição de hemaglutininas ou poder aglutino-inibidor para com glóbulos vermelhos de galinha.

As provas mais comumente usadas têm sido a do poder aglutino-inibidor de Hirst ([19]) ou modificações desta, como a de Salk, ([20]) etc., e a de proteção em camundongos brancos.

Hirst, em 1941, verificou que o virus da gripe no líquido alantóico de ovos infectados, aglutinava glóbulos vermelhos de galinha quando misturado com eles (fenômeno de Hirst). Este fenômeno está intimamente relacionado com o poder infeccioso do virus, correndo aproximadamente paralelas a habilidade do sôro imune de neutralizar o virus e a inibição da aglutinação dos glóbulos vermelhos na presença do virus.

As provas de proteção são feitas geralmente misturando-se 1.000 doses mortais de virus com diversas diluições de sôro. Cada mistura correspondendo a uma diluição do sôro é inoculada (inoculação intranasal) em uma série de 3 a 4 camundongos previamente eterizados, durando a prova 10 dias, assinalando-se os que sobrevivem e examinando os pulmões dos que morrem.

Material e Métodos

Soros. Os soros foram retirados de adultos e de crianças de 1 a 3 anos de idade, residentes em diversos bairros da cidade de São Paulo, não tendo os doadores apresentado doença febril semelhante à gripe nos últimos três meses.

Técnica da prova de sôro-proteção. Seguimos a mesma técnica descrita em nosso trabalho anterior ([21]) no qual foi feito estudo idêntico com o virus Tipo A da gripe — para melhor podermos comparar os resultados.

Em resumo, as provas do sôro-proteção foram feitas da seguinte maneira:

a) **Virus.** São retirados pulmões de camundongos infectados, quando bem doentes, e em seguida pesados e triturados na proporção de 1 para 9 partes de salina com 20% de sôro normal de cavalo (diluição 1:10). Centrifuga-se durante 15 minutos a 2.500 r. t. m. O líquido sobrenadante será a suspensão de virus para as provas.

b) **Camundongos.** São usados camundongos albinos suiços de 25 a 35 dias, em grupos de três para cada sôro ou diluição de sôro.

c) **Prova.** Sôro puro e diluições dobradas de cada sôro em salina (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) são misturados com parte igual da suspensão de virus, esta contendo 1.000 doses mortais (0,3 cc. de cada uma). Após incubação das misturas a 37°C, durante 30 minutos, é feita a inoculação intranasal, com 0,05cc. nos camundongos prèviamente eterizados. A observação é feita durante dez dias. Os camundongos que morrem são autopsiados e o exame dos pulmões deverá revelar os sinais característicos. Consideramos positiva a prova que proteger todos ou dois em três camundongos. Em cada série de provas, dois grupos de camundongos são inoculados com 1.000 doses mortais de virus, servindo de testemunha: um com o virus e sôro normal; outro, com virus e sôro imune.

Resultados e Comentários

Fizemos o mesmo número de provas do trabalho anterior (loc. cit.), isto é, 41 com soros de adultos e 10 de crianças de 1 a 3 anos de idade, que não tivessem tido doença febril semelhante à gripe nos últimos três meses.

As provas de proteção desta 2.ª comunicação foram feitas com o virus da gripe Tipo B (Lee), e soros retirados aproximadamente na mesma época em que tinham sido feitas as provas idênticas com o virus Tipo A. (*)

Vimos em nosso primeiro trabalho (loc. cit.), no qual pesquisamos anticorpos contra o virus Tipo A (W. S.), da gripe epidêmica, em adultos e crianças normais, a alta incidência de anticorpos para esse virus.

As provas de sôro-proteção deste trabalho representam uma segunda comunicação sôbre a pesquisa de anticorpos para os tipos de virus da gripe.

Na primeira, fizemos a pesquisa com o virus W. S., Tipo A; nesta segunda, com o virus Lee, Tipo B, ambos da gripe epidêmica humana.

Vimos na primeira comunicação, que com o sôro de adultos 82,9% apresentaram anticorpos neutralizantes para o virus Tipo A da gripe epidêmica, dando provas de proteção positivas; e que as provas com sôro de crianças de 1 a 3 anos de idade foram negativas, não tendo revelado a presença desses anticorpos.

(*) Por falta de camundongos deixamos de fazer em nosso primeiro trabalho a pesquisa ao mesmo tempo de anticorpos para o virus A e B.

QUADRO I

Resultado de provas de proteção feitas com soros de adultos e o virus da gripe epidêmica humana Tipo B (Lee).

		Virus B (Lee) 1.000 doses mortais					
N.º	NOME	Diluições dos soros					
		Puro	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
1	E. V. S.	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3	0/3
2	R. Z.	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
3	R. S. M.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
4	L. G. S.	3/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3
5	L. L. S.	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3	0/3
6	A. S.	3/3	3/3	1/3	0/3	1/3	0/3
7	S. V.	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3	0/3
8	A. F.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
9	E. V. C.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
10	A. S. C. C. ...	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
11	G. F.	3/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3
12	A. N. A.	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
13	J. G. B.	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
14	E. P. C.	3/3	2/3	1/3	1/3	0/3	0/3

O numerador indica o número de camundongos que permaneceram vivos até o fim da prova (protegidos); e o denominador o número de camundongos usados na prova.

		Virus B (Lee) 1.000 doses mortais					
N.º	NOME	Diluições dos soros					
15	C. H. S.	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
16	O. J. O. L. ...	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
17	R. C. C.	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
18	P. V. V.	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
19	M. S. L.	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
20	C. C.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
21	H. B.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
22	J. C. C.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
23	M. V.	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
24	W. C. S.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
25	M. L. S.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
26	I. S.	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3
27	E. R.	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
28	M. C. H.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
29	M. L. M.	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
30	C. A. O.	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3

		Virus B (Lee) 1.000 doses mortais					
N.º	NOME	Diluições dos soros					
31	W. B.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
32	M. I. C.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
33	P. S. A.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
34	S. A. B.	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
35	R. C. J.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
36	I. A. C.	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
37	P. S.	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
38	G. L. V.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
39	O. R.	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3
40	M. A. R.	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3
41	A. A.	3/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3

QUADRO 2

Resultado das provas de proteção feitas com soros de crianças e o virus da gripe epidêmica humana Tipo B (Lee)

N.º	NOME	Virus B (Lee) 1.000 doses mortais — Diluições dos soros					
		Puro	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
1	M. A.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
2	T. A. L.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
3	R. M. M.	0/3	1/3	0/3	0/3		
4	G. R.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
5	S. L.	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
6	L. P. B.	0/3	0/3	0/3	0/3		
7	O. P. B.	0/3	0/3	0/3	0/3		
8	L. G.	1/3	0/3	0/3	0/3		
9	R. V.	0/3	0/3	0/3	0/3		
10	D. S.	0/3	0/3	0/3	0/3		

QUADRO 3

Resumo das provas de proteção positivas com soros de adultos normais na cidade de São Paulo

	Com o virus da gripe epidêmica, Tipo A (W. S.)	Com o virus da gripe epidêmica, Tipo B (Lee)
Soro puro	82,9%	43,9%
" a 1:2	53,6%	34,1%
" " 1:4	36,5%	0,9%
" " 1:8	21,9%	0,4%
" " 1:16	12,0%	0,4%
" " 1:32	7,4%	0,0%
Média	35,7%	13,2%

Como se pode ver no quadro 1 deste trabalho — que foi feito em idênticas condições que o anterior, mas com o virus Tipo B (Lee) da gripe epidêmica humana — 43,9% dos soros de adultos deram prova positiva, isto com sôro puro. Como se vê nesse quadro, foram positivas, protegendo no mínimo dois em três camundongos, as seguintes 18 provas de sôro-proteção: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 11, 14, 16, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 39, 40 e 41.

Portanto com sôro puro as provas de proteção em adultos foram positivas com o virus Tipo A em 82,9% e com o virus Tipo B em 43,9%.

Nas provas feitas com diversas diluições dos soros, a diferença foi ainda maior — como se pode ver no quadro 3 (*) — pois já na diluição de 1:4, com o virus Tipo A houve 36,5% de provas positivas e apenas 0,9% com o virus Tipo B.

Como já se tinha verificado com o Tipo A, também para o Tipo B não encontramos anticorpos nos casos em que foram feitas provas de proteção com o sôro de crianças de 1 a 3 anos.

As provas que fizemos vêm demonstrar a existência entre nós das gripes A e B, com **probabilidade** da predominância da gripe produzida pelo virus Tipo A.

Dizemos probabilidade por diversos motivos: a) porque o número de provas feitas é muito pequeno para se tirar conclusões; b) por não estar ainda a prova de sôro-proteção satisfatòriamente padronizada ou mesmo talvez por não permitir ela de maneira rigorosa o doseamento do nivel de anticorpos contra os dois tipos de virus da gripe; c) e que, pelo exposto no item b), quiçá não se possa, pela maior ou menor quantidade de qualquer desses anticorpos, concluir pela maior ou menor incidência das gripes A ou B em uma população.

Contudo, a medida periódica de anticorpos será realmente de grande utilidade, não só por nos fornecer um índice da gripe no lugar como ainda por revelar aumento ou diminuição da imunidade da população.

Na gripe humana verifica-se que o sôro adquire sempre propriedades neutralizantes após cada vez que o homem é por ela atingido.

E a presença de anticorpos num indivíduo para qualquer dos virus da gripe, reflete relações passadas com esses virus.

O nivel alto de anticorpos indica as últimas epidemias e serve de índice da imunidade; ao passo que um baixo nivel de anticorpos ou a sua ausência poderá indicar uma desproteção da população e consequente futura epidemia de gripe.

Portanto, o balanço em uma população entre pessoas imunes e suscetíveis seria um fator prevalente para motivar a ocorrência de uma epidemia de gripe A ou de gripe B.

(*) No quadro 3 damos o resumo dos resultados do nosso trabalho anterior, feito com o virus Tipo A (W. S.), em confronto com o atual estudo, executado com o virus Tipo B (Lee).

RESUMO

O trabalho apresenta na sua primeira parte um rápido estudo dos conhecimentos atuais sôbre o virus B da gripe epidêmica no que se refere à forma, tamanho, comportamento em animais, transmissão experimental em seres humanos, imunidade e epidemiologia da gripe B.

Foram feitas pesquisas de anticorpos neutralizantes contra o virus da gripe epidêmica Tipo B (Lee), por meio de provas de proteção em camundongos suiços com soros de adultos e de crianças normais, sendo estas de 1 a 3 anos de idade.

Os soros foram obtidos entre pessoas residentes na cidade de São Paulo que não tivessem apresentado gripe ou resfriado febril nos últimos meses.

Resultaram negativas todas as provas feitas com o sôro de crianças, as quais não revelaram, nessa idade (1 a 3 anos), a presença de anticorpos neutralizantes para o virus Tipo B (Lee), da gripe epidêmica.

Nas provas com sôro de adultos e o mesmo virus, o resultado foi o seguinte: positivas, 43,9%; negativas, 56,1%.

De acordo com as diluições dos soros, foram as seguintes as porcentagens das provas de proteção positivas nos adultos: sôro puro — 43,9%; a 1:2 — 34,1%; a 1:4 — 0,9%; a 1:8 — 0,4%; a 1:16 — 0,4%; e a 1:32 — 0,0%.

Do confronto destes resultados com aqueles obtidos pelo autor em trabalho anterior, feito em igualdade de condições técnicas, com o mesmo número de soros e aproximadamente na mesma época, mas com o virus da gripe epidêmica Tipo A (W. S.), foi observado o seguinte nas provas feitas com sôro de adultos (tomando apenas os resultados com sôro puro):

	Com o virus Tipo A (W. S.)	Com o virus Tipo B (Lee)
Provas positivas	82,9%	43,9%
" negativas	17,1%	56,1%

A mais alta incidência de anticorpos neutralizantes encontrada para o virus Tipo A, do que para o virus Tipo B da gripe epidêmica humana, indica a possibilidade de ser mais comum em São Paulo a gripe A; contudo, deve também existir entre nós a gripe B, afirmação esta baseada na presença de anticorpos para o virus B (Lee), que foi objeto deste trabalho.

S U M M A R Y

The first part of this paper deals briefly with to-day's knowledge of human epidemic influenza virus B in relation to its form, size, behaviour in animals, experimental transmission to human beings, immunity and epidemiology.

Experiments of neutralizing antibodies against epidemical influenza virus B (Lee) were carried on by means of protection proofs in swiss rats with adult's and children's sera: the latter were between 1 and 3 years old.

The sera were obtained from persons resident in the city of São Paulo, who did not have neither influenza nor a febrile cold in the last months. All the experimentas made with children's sera were negative. as, in this age (1 to 3 years), the presence of antibodies neutralizing human epidemic influenza virus B (Lee), was not revealed.

The experiments made with undiluted sera of adults, using the same virus, gave a positive result of 43,9%.

Conforming to the sera's dilutions the percentage of the positive protection proofs in adults was the following:

Pure serum	43,9%
Diluted to 1:2	34,1%
" " 1:4	0,9%
" " 1:8	0,4%
" " 1:16	0,4%
" " 1:32	0,0%

Comparing these results with those obtained by the Author in a former study of his, made with human epidemic influenza virus A (W. S.) under the same technical conditions and with the same number of sera, and aproximately at the same time, the following results were established in the protection proofs made with adults' sera:

	Virus "A" (W. S.)	Virus "B" (Lee)
Positive Proofs	82,9%	43,9%
Negative Proofs	17,1%	56,1%

It is to be pointed out that only results obtained with pure serum have been taken into consideration.

The higher grade of incidence of neutralizing antibodies against human epidemic influenza virus A than against virus B leads to the presumption that in São Paulo influenza A is more common than influenza B; although also influenza B must have been present in this city. This assertion is substantiated by the presence of antibodies against virus B (Lee) which fact has been the object of this paper.

BIBLIOGRAFIA

1) **Smith,** W., Andrewes, C. H. and **Laidlaw,** P. P. — "A Virus Obtained from Influenza Patients". Lancet 2:66 (Julho 8), 1933.

2) **Francis,** T. Jr. — "A New Type of Virus from Epidemic Influenza". Science 92:405 (Nov. 1), 1940.

3) **Horsfall,** F. L. Jr., **Lennette,** E. H., **Rickard,** E. R. et al. — "The Nomenclature of Influenza"! Lancet 2:413 (Julho-Dez.), 1940.

4) **Magill,** T. P. — "A Virus from Cases of Influenza — Like Respiratoy Infection". Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 45-162 (Out.), 1940.

5) **Magill,** T. P. and **Francis,** T. Jr. — "Antigenic Differences in Strains of Human Influenza Virus". Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 35:463, 1936.

6) **Stuart-Harris,** C. H., **Andrewes,** C. H. and **Smith,** W. — "A Study of Epidemic Influenza". Med. Res. Counsil, Special Rep. Series N. 228 (London).

7) **Magill,** T. P. ande **Francis,** T. Jr. — "Antigenic Differences in Strains of Epidemic Influenza Virus". Brit. J. Exp. Path. 19:273, 1938.

8) **Smith,** W. and **Andrewes,** C. H. — "Serological Races of Influenza Virus". Brit. J. Exp. Path. 19:293, 1938.

9) **Hirst,** E. G. — "Studies of Antigenic Differences among Strains of Influenza A by means of Red Cell Agglutination". The J. of Exp. Med. 73:407, 1943.

10) **Eaton,** M. D. and **Beck,** M. D. — "A New Strain of Virus of Influenza B Isolated During an Epidemic in California". Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 48:177, 1941.

11) **Gordon,** I. — "Demonstration of Antigenic Differences between Different Strains of Influenza B". The J. of Immunol. 44:231, 1942.

12) **Francis,** T. Jr., **Pearson** H. E., **Salk,** Y. E. and **Brown,** P. N. — "Immunity in Human Subjects Artificially Infectd with Influenza Virus, Type B". Am. J. of Publ. Health 34:317, 1944.

13) **Henle,** W., **Henle,** G., **Slokes,** Y. Jr. and **Maris,** E. P. — "Experimental Exposure of Human Subjects to Virus of Influenza". The J. of Immunol. 52: (Feb), 1946.

14) **Hammon,** W. Mc. D. and **Howitt,** B. F. — "Epidemiological Aspects of Encephalitis in the Yakima Valley, Washington. Mixed St. Louis and Western Equine Types". Am. J. Hyg. 35:163, 1942.

15) **Hammon,** W. Mc. D. — "Encephalitis. Eastern and Western Equine and St. Louis Types. Observed in 1941 in Washington, Arizona, New-Mexico and Texas". J. A. M. A. 121:560, 1943.

16) **Sharp,** D. Y., **Taylor,** A. R., **Mc Lean,** I. W. Jr., **Dorothy Beard, Beard, J. W Feller,** A. E. and **Dingle,** J. H. — "Isolation and Characterization of Influenza Virus B (Lee Strain) '. J. of Immunol., 48:129, 1944.

17) **Sordelli,** A., **Taylor,** R. M. and **Parodi,** A. S. — "Estudo de los Virus de la Epidemia de Influenza Occurrida en la Argentina Durante el Ano 1940". Rev. del Inst. Bact. del Depart. Nac. de Hig. 10:265, 1941.

18) **The Commission on Acute Respiratory Diseases,** Fort Bragg, North Carolina — "The Periodicity of Influenza". The Am. J. of Hyg., 43:29, 1946.

19) **Hirst,** G. K. — "The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryos Infected with Influenza Virus". Science 94:22, 1941.

20) **Salk.** Y. E. — "A Simplified Procedure for Titrating Hemagglutinating Capacity of Influenza Virus and the Corresponding Antibody". The J. of Immunol. 49:87, (Aug.), 1944.

21) **Assumpção,** L. — "Verificação em provas de proteção da incidência de anticorpos para o virus da gripe epidêmica humana. em indivíduos normais. na cidade de São Paulo" Rev. Paulista de Med. Vol. **XXIX — N. 4. Outubro, 1946.**