

DETECÇÃO DO ANTÍGENO RÁBICO ATRAVÉS DAS PROVAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA E IMUNOPEROXIDASE DIRETA EM CAMUNDONGOS, EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS, SACRIFICADOS EM FASE ASSINTOMÁTICA E AGÔNICA

JANE MEGID
Professor Assistente
Universidade Estadual de Londrina

FUMIO HONMA ITO
Professor Associado
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

MEGID, J. & ITO, F.H. Detecção do antígeno rábico através das provas de imunofluorescência e imunoperoxidase direta em camundongos, experimentalmente inoculados, sacrificados em fase assintomática e agônica. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, 27(2):187-192, 1990.

RESUMO: A positividade, para raiva, dos materiais cerebrais procedentes de camundongos, foi avaliada comparativamente através das reações de Imunofluorescência Direta (IFD) e Imunoperoxidase Direta (IPD), inoculando-se com vírus rábico de rua, sessenta (60) camundongos jovens pela via intracerebral. Sacrificaram-se trinta (30) dos inoculados em fase assintomática e os demais trinta (30) em fase agônica. No grupo de animais assintomáticos, obteve-se um percentual de 83,3% de positividade com a IPD e 86,6% com a IFD, em materiais cerebrais correspondentes aos mesmos animais. Nos materiais obtidos de animais sacrificados em fase agônica, os resultados foram 100% positivos em ambas as provas. Os resultados demonstraram que a IFD apresentou uma sensibilidade aparentemente superior à da IPD na detecção do antígeno rábico.

UNITERMOS: Raiva, diagnóstico; Imunofluorescência; Reações imunológicas, imunoperoxidase; Camundongos

INTRODUÇÃO

O diagnóstico laboratorial da raiva baseia-se na presença de alterações específicas, denominadas Corpúsculos de Negri, cujo desenvolvimento está direta-

mente relacionado com a evolução da raiva (TIERKEL²³, 1976).

Embora a detecção dos corpúsculos de Negri típicos constitua um achado diagnóstico, sabe-se que no cérebro de animais infectados muitas vezes os corpúsculos não são demonstráveis com técnicas histopatológicas convencionais (JONES & HUNT¹², 1983), tornando-se necessária a inoculação intracerebral em camundongos, para confirmação dos casos que resultam negativos às colorações convencionais (FEKADU⁷, 1985 e SUREAU²², 1986).

A descrição da prova de Imunofluorescência Direta (IFD) aplicada à raiva por GOLDWASSER & KISSLING⁹, em 1958, possibilitou rapidez e confiança ao diagnóstico, por apresentar grande sensibilidade e especificidade na detecção do antígeno rábico, mesmo quando os corpúsculos de inclusão não são demonstráveis por técnicas convencionais (JONES & HUNT¹², 1983), porém o custo e a sofisticação do equipamento restringem sua utilização a poucos laboratórios nos países em desenvolvimento.

SKRABAL²¹ (1977) relatou que, dos 64 países onde a raiva ocorre, em 20 destes o diagnóstico se baseia unicamente em microscopia óptica.

A prova de Imunoperoxidase Direta (IPD), técnica descrita inicialmente por NAKANE et alii²⁰ (1966) e avaliada posteriormente em raiva por ATANASIU et alii² (1971); LEVADITI et alii¹⁷ (1971); GENOVESE & ANDRAL⁸ (1978); ANJARIA & JHALA¹ (1985); DAS et alii⁶ (1985); KOTWAL & NARAYAN¹³ (1985); KOTWAL & NARAYAN¹⁴ (1987), apresenta como vantagens a visualização dos resultados em microscópio óptico comum, persistência dos resultados nas lâminas (NAKANE & PIERCE JUNIOR¹⁹, 1967) e eliminação dos problemas decorrentes de auto fluorescência observada na IFD (KURSTAK et alii¹⁵, 1969), sendo considerada uma alternativa para IFD em laboratórios equipados com microscópio óptico comum e localizados em áreas endêmicas de raiva (KOTWAL & NARAYAN¹³, 1985).

Embora a raiva se encontre amplamente difundida no Brasil, em 1982 contávamos com apenas 24 centros diagnósticos localizados em 18 estados (GOMES¹⁰, 1983), situação que não sofreu grandes alterações até o momento atual. Torna-se necessário, portanto, o envio das amostras suspeitas a distâncias consideráveis, acarretando perdas por extravios ou má conservação do material, o que resulta em impossibilidade de um diagnóstico preciso ou na demanda de um maior período de tempo para obtenção do resultado.

BELOTTO⁴ (1985) relatou que, no Brasil, em 1984, deixaram de ser comprovados laboratorialmente 39,5% dos casos de raiva humana, sendo que 79,4% destes ocorreram no interior do país.

Visando a possibilidade de utilização da prova de IPD em substituição à IFD, em laboratórios não equipa-

dos com microscópio de imunofluorescência, e considerando a ocorrência de sacrifício prematuro de animais raivosos, a prova de Imunoperoxidase Direta foi avaliada comparativamente à prova de Imunofluorescência Direta, em impressões cerebrais de camundongos experimentalmente inoculados, sacrificados em fase assintomática e agônica da doença.

MATERIAL E MÉTODO

1 MATERIAL

1.1 ANIMAIS

1.1.1 Camundongos

Para a obtenção de cérebros infectados pelo vírus rábico, foram utilizados sessenta camundongos suíços albinos, originários da linhagem CH-3 Rockefeller, adultos jovens, com peso entre 12 a 14 gramas.

1.1.2 Hamsters

Trinta hamsters dourados, adultos jovens, com peso entre 140 e 160 gramas, foram empregados para a produção de Soro anti-rábico hiperimunizado.

1.2 VÍRUS

1.2.1 Challenge vírus standard (CVS)

Procedente do Centro Panamericano de Zoonoses (CEPANZO), Argentina, esta amostra de vírus fixo, mantida através de sucessivas passagens em camundongos pela inoculação intracerebral, foi utilizada para obter uma suspensão cerebral a 20%, para servir de diluente para absorção dos conjugados anti-rábicos.

1.2.2 Vírus de rua

Para a obtenção de cérebros infectados positivos para a raiva, foi utilizado o vírus de rua (M-13/87), isolado originariamente de um cão* e mantido durante três passagens pela via intracerebral em camundongos e armazenados em Nitrogênio líquido (-196 °C), previamente identificado pela prova de soroneutralização (JOHNSON¹¹, 1976).

Com duas passagens adicionais em camundongos, pela via intracerebral, foi preparada uma suspensão cerebral a 20% (peso/volume) que, diluída em seguida a

1:10 (volume/volume), constituiu-se no inóculo empregado no experimento.

1.3 CONJUGADOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE IFD E IPD

O procedimento adotado para a hiperimunização de hamsters foi de acordo com a técnica descrita pelo CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSSES⁵ (1975), com ligeira modificação, isto é, o antígeno foi substituído por uma vacina anti-rábica comercial** inativada, preparada em células BHK. O soro hiperimunizado foi precipitado com sulfato de amônio e dialisado em seguida. Parte desse material foi conjugado com isotiocianato de fluoresceína (SIGMA)***, segundo a técnica preconizada pelo CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSSES⁵ (1975) e destinada à reação de IFD e parte foi conjugado com peroxidase****, com base no método 1 de AVRAMEAS & TERNINCK³ (1971) para utilização na reação de IPD.

Os conjugados resultantes foram diluídos com Suspensão de Cérebro Normal (SNC) e Challenge Virus Standard (CVS)***** , revelando título final de 1:80 e 1:10, respectivamente, para as provas de IFD e IPD.

2. MÉTODO

2.1 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

Realizada segundo a técnica descrita por GOLDWASSER & KISSLING⁹ (1958)

2.2 REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE DIRETA

Efetuada com base em ATANASIU et alii² (1971) com modificação embasada em UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE²⁴ (1983), da seguinte maneira: após a realização das impressões cerebrais, as lâminas foram fixadas em acetona a -20 °C por 30 minutos, secas e imediatamente imersas durante 1 minuto em solução a 3% de TWEEN 80 em PBS e novamente secas. Delimitaram-se, com esmalte, 2 campos, os quais foram preenchidos, respectivamente, com conjugado anti-rábico de imunoperoxidase absorvido com CVS e SNC.

A reação se processou em câmara úmida, à temperatura ambiente, por um período de 3 horas. Foram reali-

** Vacina Anti-Rábica: Rabvac. Laboratório PFIZER S.A.

*** Isotiocianato de Fluoresceína, isômero I-Sigma Chemical Company

**** Horseradish Peroxidase type VI, RZ 3.0-Sigma Chemical Company

***** CVS - procedente do Centro Panamericano de Zoonoses

* Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal - FMVZ/USP.

zadas, em seguida, 3 lavagens durante 15 minutos com PBS.

Adicionou-se, consecutivamente, o substrato da reação, constituído por solução fresca de Benzidina a 0,05% em TRIS com pH ajustado para 7.0 com ácido clorídrico 1N, acrescida de 3 gotas de água oxigenada a 110 volumes para 10 ml da solução, imediatamente antes do uso. Esta reação processou-se em temperatura ambiente, durante 10 minutos, sendo as lâminas novamente lavadas em PBS por um período de 3 minutos, seguida de uma lavagem rápida em água destilada.

Após secas, realizou-se a montagem com glicerina e procedeu-se a leitura em microscópio óptico convencional.

PROCEDIMENTO

Foram inoculados, pela via intracerebral, 60 camundongos. Sacrificaram-se 30 animais no 5º dia após a inoculação, fase esta ainda assintomática e os restantes foram acompanhados durante a evolução dos sintomas identificados pela paralisia, e o sacrifício destes foi efetuado no 8º dia após a inoculação.

Após a retirada, as impressões de cada cérebro foram realizadas em 6 lâminas de vidro, próprias para a microscopia e imediatamente fixadas em acetona a -20 °C, por 30 minutos. Em seguida à fixação e secagem, as lâminas foram acondicionadas em caixas de madeira e armazenadas a -20 °C e as reações de IFD e IPD foram realizadas em 1-2 dias subsequentes. Em ambas as provas, as lâminas foram processadas em triplicata.

Como controle negativo para ambas as provas, foi utilizado o material cerebral proveniente de camundongos normais não inoculados, com procedimentos idênticos aos anteriores.

RESULTADOS

Os resultados das leituras das lâminas, procedentes de 30 camundongos sacrificados em fase assintomática e submetidas à IFD, apresentaram positividade em 26/30 (86,6%), conforme ilustrado na Tab.1.

A observação das lâminas, procedentes dos mesmos animais e submetidas à IPD, demonstrou reação positiva em 25/30 (83,3%), como pode ser visualizado na Tab. 1.

A discordância entre as provas foi encontrada no material obtido de um animal, que resultou negativo à IFD e positivo à IPD e em outras duas amostras que se apresentaram negativas à reação de IPD, porém positivas à IFD (Tab. 1).

A reação de IPD em animais assintomáticos demonstrou a presença de grânulos marrons,

distribuídos em praticamente todo o tecido nervoso visualizado, assumindo uma estrutura granular. Foram observados corpúsculos bem formados ou retraídos, somente em poucos casos.

As lâminas correspondentes aos mesmos animais, submetidas à IFD, apresentaram corpúsculos de pequeno tamanho e presença de numerosos pontos fluorescentes.

Dos 30 camundongos sacrificados em fase agônica, 30 resultaram positivos à IPD e IFD, caracterizando 100% de positividade e concordância em ambas as provas (Tab. 2 e 3).

A positividade nesses animais, na reação de IPD, foi caracterizada através da presença de corpúsculos de inclusão de cor amarronzada, facilmente visíveis com objetivas de aumento 10, 40 e 100 vezes.

Na análise da sensibilidade, verificou-se que a IFD detectou 3,3% a mais de resultados positivos comparativamente à IPD entre os animais assintomáticos.

DISCUSSÃO

De acordo com os resultados da Tab. 1, dos 30 animais sacrificados em fase assintomática da doença e submetidos às provas de IFD e IPD, obteve-se um percentual de 86,6% e 83,3% de positividade, respectivamente, com diferença de 3,3% em favor da IFD.

A menor sensibilidade, observada na IPD, poderia ser decorrente da necessidade de proporções ideais de antígeno/anticorpo para obtenção de resultados positivos (DAS et alii⁶, 1985) e também poderia ser explicada pelas limitações do conjugado; conjugados enzimaticamente inativos competiriam pelos sítios antigênicos e, desta forma, diminuiriam a sensibilidade do método (MASON et alii¹⁸, 1969 e KURSTAK et alii¹⁶, 1975).

A Tab. 2 apresenta os resultados obtidos comparativamente em animais assintomáticos e agônicos, onde pode ser observada uma menor sensibilidade relativa de ambas as provas em animais assintomáticos. Este fato confirma a conduta, previamente definida, do não sacrifício de animais suspeitos de raiva, pois o desenvolvimento dos corpúsculos estaria diretamente relacionado com a evolução da enfermidade (TIERKEL²³, 1976).

Nos resultados obtidos, observou-se um animal positivo à IPD e negativo à IFD (Tab. 1), o que provavelmente resultou de erros técnicos na realização das impressões submetidas à IFD, fato anteriormente relatado por ATANASIU et alii² (1971) como responsável por erros da IFD.

Os dados da Tab. 1 mostram uma positividade de 100% na IPD, nos animais sacrificados em fase agônica, diferindo dos resultados obtidos por ANJARIA & JHALA¹

(1985) e KOTWAL & NARAYAN¹³ (1985). A utilização do TWEEN 80, na metodologia utilizada neste experimento, pode ter sido responsável pela maior sensibilidade aqui observada, decorrente de maior penetração do conjugado, conforme referido por UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE²⁴ (1983).

A IPD necessitou de um maior período de tempo para obtenção de resultados, decorrente da utilização do conjugado obtido através do método 1 de AVRAMEAS & TERNINCK³ (1971). A técnica apresentou, porém, sensibilidade relativa comparável à da IFD.

O substrato da reação, Diaminobenzidina, tem como desvantagem o seu potencial cancerígeno, exigindo cuidados na sua manipulação.

A peroxidase é uma enzima que apresenta um custo superior ao isotiocianato de fluoresceína e possibilita um baixo teor de conjugação, resultando em conjugados de baixo título, concordante com as observações de GENOVESE & ANDRAL⁸ (1978).

A técnica, porém, apresenta as vantagens citadas por NAKANE & PIERCE JUNIOR¹⁹ (1967); ATANASIU et alii² (1971); LEVADITI et alii¹⁷ (1971); ANJARIA & JHALA¹ (1985); KOTWAL & NARAYAN¹³ (1985), relacionadas à não necessidade do uso de microscópio dotado de lâmpada de ultravioleta e câmara escura; os materiais montados nas lâminas são permanentemente corados, possibilitando estudos retrospectivos de fácil interpretação dos resultados.

A IPD apresentou sensibilidade relativa equiparável à IFD, podendo ser utilizada em laboratórios desprovidos de microscópio de imunofluorescência, porém, condicionada à realização simultânea de inoculação intracerebral em camundongos, para evitar resultados falso negativos em material com baixo título viral.

O preço dos reagentes utilizados na IPD é uma limitação, mas a não necessidade do uso de microscópio de imunofluorescência argumenta a seu favor. Os conjugados são estáveis, podendo ser armazenados por 4 meses a 4 °C ou indefinidamente quando congelados (NAKANE & PIERCE JUNIOR¹⁹, 1967). Isso possibilita sua produção por parte de instituições especializadas, e posterior distribuição para laboratórios desprovidos de microscópio de imunofluorescência.

A implantação e utilização da prova de IPD, por parte de pequenos laboratórios distribuídos ao nível nacional, poderia contribuir para melhorar a situação do diagnóstico laboratorial e, por conseguinte, agilizar as medidas de controle acionadas por parte dos órgãos responsáveis.

A prova de IPD apresentou sensibilidade relativa comparável à da IFD, podendo ser utilizada para demonstrar a presença do antígeno rábico em material cerebral, constituindo-se em uma alternativa para a IFD, em laboratórios desprovidos de microscópio de imunofluorescência.

O sacrifício dos animais suspeitos de raiva não deve ser realizado, por implicar em menor sensibilidade relativa, em ambas as provas, com possibilidade de erros diagnósticos.

MEGID, J. & ITO, F.H. Detection of rabies virus antigen by direct immunoperoxidase and fluorescent antibody test in experimentally inoculated mice, sacrificed in asymptomatic and agonizing state. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, 27(2):187-192, 1990.

SUMMARY: The positivity of the direct immunoperoxidase and the fluorescent antibody test for rabies virus antigen was comparatively evaluated in sixty young mice inoculated intracerebrally with street rabies virus. Thirty mice were sacrificed in asymptomatic state and the others in their agonizing state. The positive results obtained from impression brain smears of asymptomatic animals by direct immunoperoxidase and fluorescent antibody test were 83.3% and 86.6%, respectively. The results found in impression brain smears of agonizing animals revealed 100% positivity in both techniques. The direct immunoperoxidase test presented a relative sensitivity comparable to the fluorescent antibody test for the detection of rabies virus antigen.

UNITERMS: Rabies diagnosis; Fluorescent antibody technique; Immunological reactions, immunoperoxidase; Mice

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-ANJARIA, J.M. & JHALA, C.I. Immunoperoxidase reaction in diagnosis of rabies. *Int. J. zoonosis*, 12:267-275, 1985.
- 02-ATANASIU, P.; DRAGONAS, P.; TSIANG, H.; HARBI, A. Immunoperoxidase. Nouvelle technique spécifique de mise en évidence de l'antigène rabique intra- et extra-cellulaire en microscopie optique. *Ann. Inst. Pasteur*, 121:247-250, 1971.

CONCLUSÃO

- 03-AVRAMEAS, S. & TERNYNCK, T. Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochimistry*, 8:1175-1179, 1971.
- 04-BELOTTI, A.J. A Raiva no Brasil em 1984. Aspectos operacionais e epidemiológicos. *Rev. Fund. SESP*, 30:167-182, 1985.
- 05-CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSSES. *Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia*. Buenos Aires, 1975. (Nota técnica, 8, rev. 2)
- 06-DAS, S.K.; SARKAR, P.; SEN, G.P. Evaluation of immunoperoxidase test in routine diagnosis of rabies in animals. *Indian J. anim. Sci.*, 55:979-982, 1985.
- 07-FEKADU, 1985 apud KHAN, M.A.; DIESCH, S.L.; GOYAL, S.M. Current status of rabies. *Int. J. zoonoses*, 13:215-229, 1986.
- 08-GENOVESE, M.A. & ANDRAL, L. Comparaison de deux techniques utilisées pour le diagnostic de la rage: l'immunofluorescence et l'immunopéroxidase. *Rec. Méd vét.*, 154:667-671, 1978.
- 09-GOLDWASSER, R.A. & KISSLING, R.E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 98:219-223, 1958.
- 10-GOMES, F.J.P. Programa nacional de controle da raiva no Brasil. *Rev. Fund. SESP*, 28:165-175, 1983.
- 11-JOHNSON, H.N. La prueba del indice de neutralizacion del virus en ratones. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H. *La rabia: tecnicas de laboratorio*. 3.ed. Ginebra, Organizacion Mundial de la Salud, 1976. p.98-101.
- 12-JONES, T.C. & HUNT, R.D. *Veterinary pathology*. 5.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1983. p.458-464.
- 13-KOTWAL, S. & NARAYAN, K.G. Direct immunoperoxidase test in the diagnosis of rabies - an alternative to fluorescent antibody test. *Int. J. zoonoses*, 12:80-85, 1985.
- 14-KOTWAL, S. & NARAYAN, K.G. Comparative evaluation of ELISA, FAT and immunoperoxidase tests in the diagnosis of rabies. *Indian J. anim. Sci.*, 57:65-71, 1987.
- 15-KURSTAK, E.; COTE, J.R.; BELLONCIK, S. Etude de la synthese et de la localisation des antigenes du virus de la denso nucléose (VDN) a l'aide d'anticorpos conjugués a l'enzyme peroxidase. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 268:2309-2312, 1969.
- 16-KURSTAK, E.; TIJSSEN, P.; KURSTAK, C.; MORISSET, R. Progress in the application of new immunoenzymatic methods in virology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 254:369-384, 1975.
- 17-LEVADITI, J.C.; ATANASIU, P.; GAMET, A.; GUILLON, J.C. Le diagnostic de la rage. Problèmes soulvés par les méthodes d'immuno-fluorescence et d'immuno-péroxidase. *Arch. Inst. Pasteur Algér.*, 49:75-83, 1971.
- 18-MASON, T.E.; PHIFER, R.F.; SPICER, S.S.; SWALLOW, R.A.; DRESKIN, R.B. An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, 17:563-569, 1969.
- 19-NAKANE, P.K. & PIERCE JUNIOR, G.B. Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J. cell. Biol.*, 33:307-318, 1967.
- 20-NAKANE, P.K.; SRI RAM, J.; PIERCE, G.B. Enzyme-labeled antibodies for light and electron microscopic localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, 14:789-791, 1966.
- 21-SKRABAL, 1977 apud DERAKSHAN, I.; BAHMANYAR, M.; FAIAZ, A.; MOHAMAD, M.; NOORSALEHI, S.; AHOURAII, P. Light-microscopial diagnosis of rabies. A reappraisal. *The Lancet*, 1(8059):302-303, 1978.
- 22-SUREAU, P. Les techniques rapides de diagnostic de laboratoire de la rage. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 63:183-197, 1986.
- 23-TIERKEL, E.S. Investigacion microscópica rapida de corpusculos de Negri y preparacion de muestras para las pruebas biológicas. In: KAPLAN, N.M. & KOPROWSKI, H. *La rabia, tecnicas laboratorio*. 3.ed. Ginebra, Organizacion Mundial de la Salud, 1976. p.51.
- 24-UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Animal and Plant Health Inspeccion Service. *Official diagnostic tests for pseudorabies and laboratories approved to conduct official serological tests*. Washington, 1983. (Veterinary services memorandum, 561.33)

