

**EMPREGO DE SORO ANTI-RÁBICO
TERAPÊUTICO NA PRODUÇÃO DE CONJUGADO
PARA A REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA NA
RAIVA**

LEONARDO JOSÉ RICHTZENHAIN

Professor Doutor
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

FUMIO HONMA ITO

Professor Associado
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

JOSÉ ANTONIO JEREZ

Professor Doutor
Instituto de Ciências Biológicas da USP

ANA RITA YUMI MAVATARI

Auxiliar de Ensino
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

AVELINO ALBAS

Pesquisador Científico
Instituto Biológico - Presidente Prudente

RICHTZENHAIN, L.J.; ITO, F.H.; JEREZ, J.A.; MAVATARI, A.R.; ALBAS, A. Emprego de soro anti-rábico terapêutico na produção de conjugado para a reação de imunofluorescência na raiva. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v.28, n.2, p.249-50, 1991.

RESUMO: Uma metodologia de produção de conjugado imunofluorescente anti-rábico a partir de soro hiperimune eqüino para fins terapêuticos é descrita. A fração IgG do soro é purificada de forma simples e rápida e posteriormente marcada com o fluorocromo. Através dessa metodologia, laboratórios que não disponham de infraestrutura para produção de soro hiperimune anti-rábico podem obter conjugados de boa qualidade.

UNTERMOS: Raiva, diagnóstico; Imunofluorescência; Soros imunes, sorohiperimune de eqüino; IgG, purificação; Soro anti-rábico terapêutico

INTRODUÇÃO

A reação de Imunofluorescência Direta (IFD) é o método mais exato para o diagnóstico laboratorial da raiva, devendo ser praticada por todos os centros encarregados de tal serviço (DEAN; ABELSETH⁴, 1976).

Em laboratórios que contam com pouca infraestrutura, a metodologia de produção de soro hiperimune anti-rábico, envolvendo produção do antígeno viral e imunização sistemática dos animais, dificulta a obtenção de conjugados (KOTWAL; NARAYAN⁷, 1987).

Entretanto, tendo em vista que em diversos países instituições especializadas produzem soro eqüino anti-rábico para fins terapêuticos em grande escala, o emprego do mesmo para a obtenção de conjugados representa outra aplicação de grande utilidade para tais laboratórios.

O presente trabalho objetivou avaliar o emprego de um soro anti-rábico eqüino, produzido para fins terapêuticos, na produção de conjugado para a IFD da raiva.

MATERIAL E MÉTODO

Soro hiperimune de eqüino. O soro hiperimune bruto de eqüino foi proveniente do Instituto Butantan de São Paulo. O antígeno utilizado na imunização dos animais constituiu-se da amostra PV do vírus da raiva cultivada em células BHK (CONSALES et al.², 1988). O "pool" de soros hiperimunes apresentou um título de 350 UI/ml.

Purificação de IgG eqüina. A fim de diminuir o teor de reações inespecíficas, a fração IgG do soro hiperimune foi purificada para posterior conjugação com o fluorocromo (LARGHI⁸, 1975). Para tanto, a fração gama-globulínica foi inicialmente obtida por precipitação com sulfato de amônio, de acordo com HEBERT et al.⁶ (1973). A purificação da fração IgG foi realizada através do método de CORTIER et al.³ (1984), substituindo-se o DEAE-Trisacryl M pelo DEAE-Celulose. A pureza da IgG, obtida no primeiro pico de proteína, foi avaliada pela técnica de imunoeletroforese segundo FERRI; COSSERMELL⁵ (1964).

Conjugação. A conjugação da IgG anti-rábica ao Isotiocianato de Fluoresceína (ITCF), pelo método da adição rápida do fluorocromo e a retirada do ITCF livre por cromatografia em Sephadex G 25, foram realizadas segundo o descrito por CAMARGO¹ (1973). Para estocagem a -20 °C o conjugado foi diluído volume a volume com glicerina.

Emprego de soro anti-rábico terapêutico na produção de conjugado para a ...

Reação de IFD. A reação de IFD, incluindo a titulação do conjugado foi realizada de acordo com LARGHI⁸ (1975).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na purificação da IgG equina por cromatografia de troca iônica, a avaliação imunoelétrica do primeiro pico de proteína obtido revelou que a substituição do DEAE-Trisacryl M pelo DEAE-Celulose não interferiu no método de obtenção de IgG descrito por CORTIER et al.³ (1984).

Após a titulação em cérebro de camundongos experimentalmente infectados segundo a técnica descrita por LARGHI⁸ (1975), o conjugado revelou uma diluição ótima de uso de 1:90.

A marcação da fração IgG purificada e o emprego de soro de equinos hiperimunizados com vírus cultivado em células renais de hamster, não sendo portanto estimulada a produção de anticorpos contra tecido nervoso, devem ter contribuído para o baixo teor de reações inespecíficas observadas. Assim, a prévia absorção do conjugado com cérebro normal de camundongo (LARGHI⁸, 1975) foi dispensável.

No processamento de diversas amostras de tecido nervoso de diferentes espécies animais enviadas para diagnóstico, obtiveram-se os mesmos resultados com esse conjugado ou com aquele produzido em hamsters segundo a técnica descrita por LARGHI⁸ (1975).

Face à simplicidade da metodologia adotada e aos resultados obtidos, pode-se concluir que o emprego de soro anti-rábico equino, preparado para fins terapêuticos na produção de conjugados para a IFD da raiva, constitui uma alternativa de grande utilidade em laboratórios que não disponham de infraestrutura para a produção de soros hiperimunes.

RICHTZENHAIN, L.J.; ITO, F.H.; JEREZ, J.A.; MAVATARI, A.R.; ALBAS, A. Use of therapeutic antirabic serum in the production of conjugate for the direct immunofluorescence of rabies. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v.28, n.2, p.249-50, 1991.

SUMMARY: A procedure for the production of antirabies fluorescent antibody conjugate using equine therapeutic hyperimmune serum is described. The IgG fraction is rapid and easily purified and after labelled with the fluorochrome. By this procedure, laboratories without facilities to take up the work of raising antirabic serum can obtain high quality conjugates.

UNITERMS: Rabies, diagnosis; Fluorescent antibody technique; Immune sera, equine hyperimmune serum; IgG, purification; Therapeutic antirabic serum

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-CAMARGO, M.E. *Introdução às técnicas de imunofluorescência.* São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, 1973. (Apostila)
- 02-CONSALES, C.A.; VALENTINI, E.J.G.; ALBAS, A.; MENDONÇA, R.M.Z.; FUCHES, R.M.M.; SOARES, M.A.; PEREIRA, C.A. The preparation of cultured rabies virus and the production of antiserum for human use. *J. biol. stand.*, v.16, p.27-32, 1988.
- 03-CORTIER, G.; BOSCHETTI, E.; CHARLEY-POULAIN, J. Improved method for IgG purification from various animal species by ion exchange chromatography. *J. Immunol. Methods.*, v.66, p.75-9, 1984.
- 04-DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K. Prueba de los anticuerpos fluorescentes. In: KAPLAN, M.M.; KOPROWSKY, H. *La rabia: técnicas de laboratorio.* 3.ed. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1976. p.75-87. (Série de Monografias, 23)
- 05-FERRI, R.G.; COSSERMELLI, W. Analyse immunoelectrophorétique. Micro et macro méthodes. *Rev. franc. Étud. clin. biol.*, v.9, p.134-8, 1964.
- 06-HEBERT, G.A.; PELHAM, P.L.; PITTMAN, B. Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat antisera. *Appl. Microbiol.*, v.25, p.26-36, 1973.
- 07-KOTWAL, S.; NARAYAN, K.G. Comparative evaluation of ELISA, FAT and immunoperoxidase tests in the diagnosis of rabies. *Indian J. anim. Sci.*, v.57, p.65-71, 1987.
- 08-LARGHI, O. *Prueba de anticuerpos fluorescentes para la rabia.* Buenos Aires, Centro Panamericano de Zoonosis, 1975. p.9-21. (Nota Técnica, 8)

Recebido para publicação em 16/05/91
Aprovado para publicação em 10/10/91