

A UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA COMPARATIVAMENTE COM OS MÉTODOS HISTOQUÍMICO E BIOLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DA RAIVA¹

RENATO AUGUSTO DA SILVA², NORMA MORAES DA SILVA³

e ROMEU SOARES GUIMARÃES³

SINOPSE.— Foram empregados, comparativamente, os métodos de imunofluorescência, histoquímico (pesquisa de corpúsculos de Negri, pelo método de Faraco) e inoculação em camundongos, em 461 cérebros de animais suspeitos de raiva e um cérebro de origem humana de um caso clinicamente diagnosticado. Observou-se que a imunofluorescência se revelou tão sensível quanto a inoculação em camundongos e, ainda, que a imunofluorescência proporcionou resultados mais satisfatórios que a pesquisa de corpúsculos de Negri, com exceção de dois cérebros de bovino que foram, na imunofluorescência, negativos, e na prova de inoculação, positivos.

Foram examinadas também, 77 glândulas submaxilares e 63 cérebros de diferentes espécies, duas amostras de líquor e uma de saliva de origem humana, pelos métodos de imunofluorescência e inoculação em camundongos, não encontrando diferença entre os dois métodos empregados.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico laboratorial da raiva baseou-se, por muitos anos, nos resultados dos exames histopatológicos e biológicos. A partir dos trabalhos de Goldwasser e Kissling (1958), o método de imunofluorescência foi introduzido no diagnóstico da raiva, por ser uma técnica vantajosa, em relação às demais, pela sua rapidez e especificidade. Estes pesquisadores informaram que a técnica de anticorpos fluorescentes pode ser utilizada para corar antígenos de vírus de rua e de vírus fixo nos cérebros de camundongos experimentalmente infectados. Posteriormente, Goldwasser *et al.* (1960) indicaram, ainda, que a mesma técnica de imunofluorescência podia ser usada para a evidenciação de antígenos rábicos nas glândulas salivares de animais infectados pelo vírus da raiva.

McQueen *et al.* (1960) estudaram, comparativamente, o teste de imunofluorescência com o exame microscópico para a pesquisa de corpúsculos de Negri e com a inoculação em camundongos no diagnóstico de 825 materiais suspeitos de raiva, concluindo que o teste de imunofluorescência é tão sensível quanto a prova de inoculação em camundongos e superior à pesquisa de corpúsculos de Negri.

Lenette *et al.* (1965), usando os três métodos para o diagnóstico da raiva em um total de 4.230 materiais suspeitos, encontraram 363 positivos, dos quais 361

(99,4%) foram evidenciados pelo método de anticorpos fluorescentes; 357 (98,3%) pela inoculação em camundongos e 239 (65,8%) pela presença de corpúsculos de Negri (método de Sellers).

Mocsáry e Kovacs (1968) examinaram 1.600 materiais, sendo 348 deles submetidos ao teste de inoculação em animais. Das amostras que se revelaram infecciosas, 99% foram positivas à imunofluorescência e 85% aos corpúsculos de Negri. Os resultados da imunofluorescência e inoculação concordaram em 98,8% dos casos, nas amostras infecciosas, e 98,5%, nas amostras não infecciosas.

Atanasiu *et al.* (1968), empregando as técnicas de imunofluorescência, inoculação em camundongos e métodos histopatológicos para o diagnóstico da raiva, concluíram que a inoculação intracerebral em camundongos é a técnica mais fiel, porém, lenta. A imunofluorescência proporciona melhores resultados que a pesquisa de corpúsculos de Negri quando o material a examinar se encontra em bom estado.

Richter *et al.* (1969), empregando os métodos de imunofluorescência e inoculação em camundongos não obtiveram diferença entre os dois métodos.

No presente trabalho, são apresentados os resultados das provas de imunofluorescência comparativamente com os métodos de pesquisa de corpúsculos de Negri e inoculação em camundongos, em materiais suspeitos de raiva examinados nos últimos anos.

MATERIAL E MÉTODOS

A partir do ano de 1968, o Setor de Virologia do então Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS)⁴ vem utilizando a técnica de anticorpos fluorescentes (método direto) no diagnóstico

⁴ Posteriormente modificado para Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul, mantida a sigla IPEACS.

¹ Aceito para publicação em 17 fev. 1972.
Apresentado no XII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

² Veterinário, Chefe do Setor de Virologia do Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul (IPEACS), Professor Adjunto do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, e bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

³ Veterinário do Setor de Virologia do IPEACS, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26.

da raiva. Foram examinados, pela técnica de imunofluorescência comparativamente com os métodos de pesquisa de corpúsculos de Negri e inoculação em camundongos, 461 cérebros de diferentes animais domésticos

rais, na preparação de esfregaços, em lâminas, de Corno de Ammon ou de outras porções do sistema nervoso central, maceração pela amônia, fixação pelo fixador de Heidenhain e coloração rápida pelo corante de Mann.

QUADRO 1. Resultados dos exames de materiais suspeitos de raiva, pela técnica de imunofluorescência, pesquisa de corpúsculos de Negri e inoculação em camundongos

Materiais examinados		Imunofluorescência		Corpúsculos de Negri		Inoculação em camundongos	
Espécies	N.º de cérebros	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Bovinos	102	31 (30,4%)	71	25 (24,5%)	77	33 (32,3%)	66
Equídeos	11	2 (18,1%)	9	0 (0%)	11	2 (18,1%)	9
Caninos	301	64 (21,2%)	237	44 (14,6%)	257	64 (21,2%)	237
Felinos	41	4 (9,7%)	37	3 (7,3%)	38	4 (9,7%)	37
Suícos	4	1	3	0	4	1	3
Caprinos	2	1	1	1	1	1	1
Homem (caso 2)	1	1	0	1	0	1	0
Totais	462	104	358	74	388	106	356

QUADRO 2. Resultados dos exames de materiais suspeitos de raiva pelas técnicas de imunofluorescência e inoculação em camundongos

Materiais examinados		Imunofluorescência		Inoculação em camundongos		Total
Espécies	Natureza do material	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Bovinos	Cérebro	16	29	16	29	45
	Glândulas submaxilares	3	4	3	4	7
Caninos	Cérebro	0	15	0	15	15
	Glândulas submaxilares	24	32	24	32	56
Felinos	Cérebro	0	1	0	1	1
	Glândulas submaxilares	4	10	4	10	14
Equídeos	Cérebro	1	1	1	1	2
Homem (mulher, caso 1)	Líquor	0	1	0	1	1
	Saliva	0	1	0	1	1
Homem (homem, caso 2)	Líquor	0	1	0	1	1

e, ainda, fragmentos de cérebro de um caso de raiva humana, clinicamente diagnosticado. Ao mesmo tempo foram examinados, por imunofluorescência e inoculação em camundongos, 77 glândulas submaxilares de diferentes espécies animais e 63 cérebros, os quais, por suas condições de conservação, não foram submetidos ao método histoquímico para a pesquisa de corpúsculos de Negri, além de duas amostras de líquido e uma de saliva de origem humana. A procedência desses materiais está indicada nos Quadros 1 e 2.

Os materiais para exame chegavam ao laboratório conservados em temperatura de refrigeração ou em glicerina e algumas vezes sem conservação, quando se tratava de morte ocorrida em locais próximos ao IPEACS. Nestes casos, o cadáver era submetido à necropsia pelos patologistas do Setor de Anatomia Patológica, sendo retiradas, a nosso pedido, porções do sistema nervoso central e glândulas submaxilares.

No caso de materiais conservados em glicerina, tanto para o método de imunofluorescência, como para a pesquisa de corpúsculos de Negri, procedia-se à lavagem dos tecidos em soro fisiológico estéril durante duas a três horas, tendo o cuidado de trocar o soro três vezes.

Exames realizados

Método histoquímico. Na realização desta prova, foi utilizada a técnica de Faraco (1938), adotada há vários anos com excelentes resultados. Consiste, em linhas ge-

Método biológico. Esta prova consiste na preparação de suspensões a 10%, em soro fisiológico estéril, dos tecidos a examinar. Para fim de controle das contaminações, adicionam-se 1.000 U.I. de penicilina potássica e 1 mg de di-hidro-estreptomicina para cada mililitro de suspensão. Em seguida, centrifuga-se a suspensão durante 10 minutos a 2.500 rpm.

Para esta prova, foram utilizados, de preferência, camundongos lactentes, que foram inoculados pela via intracraniana, na dose de 0,03 ml. Estes animais foram observados pelo período de 21 dias.

Método de imunofluorescência. Na execução desta técnica foi seguido o método direto OMS (1967). Os esfregaços eram feitos de tecido nervoso, representado por porções da córtex cerebral, Corno de Ammon, cerebelo e bulbo, ou de tecido não nervoso. Cada lâmina recebia duas impressões do tecido a examinar, fazendo-se um mínimo de seis lâminas para cada material.

Feitas as impressões, as lâminas eram postas a secar em temperatura ambiente por 10 minutos e, após, eram mergulhadas em frasco de Coplin, com acetona, na temperatura de menos 20°C, por 30 minutos, exceto quando se tratava de impressões de glândulas salivares ou saliva, que eram deixadas por quatro horas nesta fixação. Em seguida, eram retiradas as lâminas deixando-se escorrer o restante de acetona na própria tempe-

ratura de menos 20°. Após secagem no congelador, as lâminas eram removidas e colocadas na temperatura ambiente para eliminação da condensação. Circundavam-se as impressões com esmalte, colocando-se as lâminas em uma câmara úmida. A impressão próxima à etiqueta da lâmina recebia 2 gotas do conjugado diluído, conforme seu título, em suspensão de cérebro de camundongo normal. A outra impressão era corada da mesma maneira com conjugado diluído em suspensão de cérebro de camundongos infectados com amostra de raiva vírus fixo. A câmara úmida contendo as lâminas era incubada a 37°C durante 30 minutos. Após a incubação, as lâminas eram retiradas da câmara, lavando-se as impressões com salina tamponada (pH 7,4); em seguida, as lâminas eram imersas em salina tamponada durante 10 minutos. A seguir, as lâminas eram lavadas em água destilada e secadas na temperatura ambiente em posição vertical. Finalmente, fazia-se a montagem das lâminas com glicerina tamponada (pH 7,6).

Preparo das suspensões de cérebro de camundongos

A suspensão de cérebro de camundongo normal a 20% para diluir o conjugado era preparada usando-se como diluente uma suspensão a 10% de gema de ovo, obtida de ovos embrionados com seis a sete dias de incubação, em salina tamponada com fosfato (pH 7,6).

Após centrifugação por 10 minutos a 1.000 rpm, distribuía-se o sobrenadante em tubos contendo quantidades suficientes para um dia ou uma semana de trabalho e conservava-se em temperatura de menos 20°C até o momento de usar. A suspensão de cérebro de camundongo infectado era preparada da mesma maneira, usando-se cérebros de camundongos inoculados intracranialmente com suspensão de vírus rábico fixo.

A rotina de trabalho incluía a utilização da amostra de vírus rábico fixo "Pasteur", contendo atualmente 3.168 passagens em cérebro de coelho.

Foram utilizados conjugados anti-rábitos procedentes do Instituto Pasteur de Paris, gentilmente cedidos pelo Dr. Pascu Atanasiu; BBL (partida número 6021930) e conjugado preparado por nós, devidamente padronizado.

Para a microscopia, foi utilizado, desde o início do trabalho até julho de 1969, um microscópio Leitz Ortholoux, com canhão monocular, equipado com: ocular 10 x com filtro de barragem U,V; objetiva 10 x A 0,25; condensador de campo claro A 1,40; fonte de luz por lâmpada de mercúrio de 150 W, marca Philips, com filtro calorífico e filtros excitadores UV de 2 e 4 mm UGI.

Mais recentemente, o IPEACS adquiriu aparelhagem moderna para imunofluorescência, representada por um microscópio Reichert Fluorpan; triocular, equipado com: oculares PK8; objetivas 16/0.32, 160/ e 40/0.65, 160/0.17, rotineiramente utilizadas e mais 60/0.95, 160 e 95/1.18 e 160/0.17, sendo estas duas últimas de imersão; condensador de campo escuro; lâmpada de mercúrio HBO 50/L2; filtro excitador n.º 22 (UV pass filter 1.5 mm UGI), e filtro de barragem n.º 2 no canhão.

RESULTADOS

Os resultados obtidos na aplicação dos métodos de imunofluorescência, pesquisa de corpúsculos de Negri e inoculação em camundongos em 462 materiais nervosos

estão sumariados no Quadro 1. Pela análise destes resultados, verifica-se concordância entre os métodos de imunofluorescência e inoculação em materiais de diferentes espécies, com exceção de dois materiais de bovino, conservados em glicerina. No Quadro 1 estão indicadas, ainda, para comparação entre os três métodos empregados, as percentagens de positividade por espécie animal, excetuados os materiais humano, de caprino e de suíno, por não constituírem amostragem representativa.

O Quadro 2 expressa os resultados das provas de imunofluorescência e inoculação com 77 glândulas submaxilares, 63 cérebros, líquor e saliva de origem humana, havendo perfeita correlação entre os dois métodos empregados.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A técnica de imunofluorescência reúne, indiscutivelmente, as vantagens de rapidez e especificidade, quando se tem em foco o diagnóstico. No entanto, os métodos histoquímico, para a pesquisa de corpúsculos de Negri, e de inoculação em camundongos não foram dispensados pelos laboratórios que têm a seu cargo o diagnóstico da raiva. O isolamento do vírus é considerado como a prova mais fiel para o diagnóstico da raiva, apesar de constituir um método lento. Com a finalidade de acelerar o diagnóstico, Webster (1942) recomenda o sacrifício de um dos camundongos inoculados a partir do quinto dia e outro, cada dia consecutivo, para investigação dos corpúsculos de Negri, pois está demonstrado que eles se formam antes do aparecimento dos sintomas de raiva. Atanasiu *et al.* (1968) recomendam o exame dos cérebros dos animais inoculados a partir do sexto dia de inoculação pelo método de imunofluorescência.

Com o mesmo propósito, isto é, o de acelerar o diagnóstico da raiva, Schneider, (1969) notificou recentemente o desenvolvimento de uma prova baseada no exame da córnea do animal raivoso pelo método de imunofluorescência. Com este método pôde diagnosticar a enfermidade antes do aparecimento dos sintomas clínicos em mais de 70% dos camundongos infectados no laboratório.

Considera-se, também, uma das grandes vantagens do método de imunofluorescência a de demonstrar a presença de antígeno viral rábico em tecidos que contém a substância inibidora da raiva (SIR), quando outras provas falham. Esta substância foi demonstrada pela primeira vez por Carski *et al.* (1962), quando trabalhavam com raposas e zorrilos infectados experimentalmente.

No presente estudo comparativo entre os três métodos de laboratório empregados no diagnóstico da raiva, foi verificada a sensibilidade da prova de imunofluorescência em um total de 605 materiais provenientes de diferentes animais, inclusive do próprio homem. Observou-se concordância entre os métodos de imunofluorescência e inoculação em camundongos, exceto no que se refere a dois materiais de bovino conservados em glicerina.

Com relação ao teste de imunofluorescência e ao método histoquímico de Faraco, foram obtidas, nos materiais de bovino, as percentagens de positividade de 30,4 e 24,5, respectivamente. Os materiais de cães deram 21,2 e 14,6, para imunofluorescência e Faraco.

É sabido que o corpúsculo de Negri pode faltar na infecção rábica. Assim, Johnson (1942), em 711 casos de raiva comprovada no cão, verificou que 10,5% destes animais foram negativos e 137 cérebros de raposas deram positivos na prova corpúsculos de Negri. De 188 cães infectados experimentalmente por inoculação intramuscular, 39,7% foram Negri negativos. Destes 188 cães, 46% apresentaram raiva furiosa, dos quais 21% foram Negri negativos.

Santos (1957) relatou que em 55 cães mortos de raiva, 15 animais foram negativos, dando uma percentagem de 27,4%. Nos equídeos, em 11 casos, 6 apresentaram corpúsculos de Negri. Nos bovinos, em 33 casos estudados, todos foram Negri positivos. O caprino se comportou da mesma maneira ocorrendo, em 4 animais raivosos, corpúsculos de Negri. Em 4 gatos, apenas 2 demonstraram corpúsculos de Negri. Em 2 carnívoros selvagens, raposa e jaguar, vivendo em cativeiro, comprovou-se a presença de corpúsculos de Negri.

Pelos dados expostos de confrontação entre os três métodos (imunofluorescência, histoquímico de Faraco e inoculação em camundongos) no diagnóstico da raiva, concluiu-se que o método de imunofluorescência se revelou tão sensível quanto a prova de inoculação em camundongos e superior ao método de Faraco para a pesquisa de corpúsculos de Negri.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos ao Dr. Pascu Atanasiu, Virologista do Instituto Pasteur de Paris e Consultor em Raiva da Organização Mundial de Saúde, pela doação do conjugado para a raiva. Outrossim, expressamos os nossos agradecimentos ao Dr. Layette Estelita R. de Mello, Professor de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela ajuda técnica no preparo do conjugado para a raiva, e aos laboratoristas do Setor de Virologia, Srs. Adhemar Lourenço e Argemiro Lourenço, pela dedicação que demonstraram durante o desenvolvimento de tão exaustivo trabalho.

REFERÊNCIAS

- Atanasiu, P., Gamet, A. & Guillon, J.C. 1968. Limites du diagnostic de la rage au laboratoire. *Recl Méd. vét.* 144(11): 1083-1088.
- Carski, T.R., Wilmsnack, R.E. & Sikes, R.K. 1962. Pathogenesis of rabies in wildlife. II. Fluorescent antibody studies. *Am. J. vet. Res.* 23:1048.
- Faraco, J. 1938. Nova técnica para a obtenção de esfregaço por "compressão e distensão" de partes do encéfalo, medula espinal, etc., para a pesquisa do corpúsculo de Negri (coloração rápida dos esfregaços pelo método de Mann). *Revta Biol. Hig., S. Paulo*, 90:90-96.
- Goldwasser, R.A. & Kissling, R.E. 1958. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 98:219-223.
- Goldwasser, R.A., Kissling, R.E. & Carski, T.R. 1960. Coloración con anticuerpos fluorescentes de antígenos de virus de la rabia en las glándulas salivales de animales rabiosos. *Boln Of. Sanit. pan-am.* 49(6):582-588.
- Johnson, H.N. 1942. The significance of the Negri body in the diagnosis and epidemiology of rabies. *Illinois Vet.* 81(5): 382-387.
- Lennette, E.H., Woodie, J.C., Nakamura, K. & Magoffin, R.L. 1965. The diagnosis of rabies by fluorescent antibody method (F.R.A.) employing immune hamster serum. *Hlth Lab. Sci.* 2(1):24-34.
- McQueen, J.L., Lewis, A.L. & Schneider, N.J. 1960. Rabies diagnosis by fluorescent antibody. I. Its evaluation in a public healthy laboratory. *Am. J. publ. Hlth* 50:1743-1752.
- Moesáry, E. & Kovács, G. 1968. Laboratory diagnosis of rabies by the immunofluorescent technique: diagnostic value of the method. *Magy. állatorv. Lap.* 22:545. (*Vet. Bull.* 39(5), Abstr. 2000)
- Organization Mondiale de la Santé 1967. La rage. Techniques de laboratoire. Monographie n.º 23, OMS Geneve.
- Richter, F., Del Agulla, C. & Kubus, V. 1969. Uso del método de imunofluorescência en el diagnóstico de la rabia. *Zoonosis*, B. Ayres, 11(2):83-85.
- Santos, J.A. dos 1957. Anatomia patológica da raiva. 1.º Simpósio Brasileiro de Raiva, promovido pela Soc. Bras. Med. Vet., Rio de Janeiro.
- Schneider, L.G. 1969. The cornea test - a new method for the *in vivo* diagnosis of rabies. *Zentbl. VetMed.* 16B: 24-31. (*Vet. Bull.* 39(9), Abstr. 3764)
- Webster, L.T. 1942. Rabies. Macmillan Co., New York, p. 40.

ABSTRACT.- Silva, R.A. da; Silva, N.M. da; Guimarães, R.S. [A comparison of the immunofluorescent with histochemical and biological tests in the diagnosis of rabies]. A utilização do método da imunofluorescência comparativamente com os métodos histoquímico e biológico no diagnóstico da raiva. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* (1973) 8, 1-4 [Pt, en] IPEACS, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, Brazil.

A comparison was made of the efficiency of the fluorescent antibody technique, Negri body examination and mouse inoculation test for the detection of rabies. The brains from four hundred and sixty one rabies suspect animals and the brain of a man who died of rabies were examined by the methods cited above. Also, 77 submaxillary glands and 63 brains of animals, plus two samples of spinal fluid and one of saliva from human cases suspected of rabies, were examined by the fluorescent antibody technique and mouse inoculation test.

The fluorescent antibody technique was comparable in efficiency to the mouse inoculation test and superior to the Negri body examination.