

DIAGNÓSTICO DA RAIVA PELA TÉCNICA DE IMUNOFLOURESCÊNCIA EM CORTES DE TECIDOS INCLUÍDOS EM PARAFINA¹

NORMA MORAES DA SILVA² e RENATO AUGUSTO DA SILVA³

SINOPSE.— Empregando a técnica de Sainte-Marie para fixação e inclusão de tecidos em parafina e usando o método direto de imunofluorescência, foram examinados cortes de tecidos provenientes de três camundongos inoculados experimentalmente com vírus rábico fixo "Pasteur", de onze cães e de seis bovinos naturalmente infectados pelo vírus da raiva. O antígeno viral rábico foi identificado no cérebro e no cerebelo dos citados animais e, também, nas glândulas submaxilares de seis cães e de três bovinos.

INTRODUÇÃO

A observação de tecidos de animais infectados pelo vírus da raiva estava limitada ao uso de cortes por congelação devido à rápida desnaturação do antígeno pelos procedimentos usuais de fixação (Fischman 1969). Sainte-Marie (1962) descreveu uma técnica de fixação na qual o procedimento usual de embebição de tecido com parafina foi usado para imunofluorescência com vírus e também, com outros antígenos.

Em trabalho anterior (Silva *et al.* 1971), empregamos comparativamente os métodos de imunofluorescência, histoquímico (Faraco) e inoculação em camundongos em 462 materiais nervosos de várias espécies de mamíferos, constituindo a presente publicação o resultado da utilização do método de imunofluorescência em materiais incluídos em parafina, provenientes de 20 animais, para fins comparativos com os métodos de diagnóstico já empregados.

MATERIAL E MÉTODOS

Examinaram-se cortes de diferentes tecidos, provenientes de 20 animais positivos para a raiva, pelas técnicas de imunofluorescência em impressões de tecidos, pesquisa de corpúsculos de Negri (casos de sistema nervoso central) e inoculação em camundongos, assim distribuídos:

- a) 3 cérebros de camundongos inoculados experimentalmente com vírus rábico fixo Pasteur;
- b) 11 cérebros de cães, naturalmente infectados com raiva, recebidos pela Seção de Vírus do Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul (IPEACS) para fins de diagnóstico; de 5 destes cães foram examinadas ainda as glândulas submaxilares, e, de um deles, registrado sob o n.º 5.065, também o pulmão, baço, fígado, coração, rins e bexiga;
- c) 6 cérebros de bovinos também recebidos para fins de diagnóstico; de 4 deles foram examinadas as glândulas submaxilares, e, de um outro, registrado sob o n.º 5.200, a córnea, os rins, as supra-renais, o baço e os pulmões, além das glândulas submaxilares e sistema nervoso central.

Para a fixação dos fragmentos dos tecidos a examinar, foi seguida a técnica preconizada por Sainte-Marie (1962), que, em linhas gerais, é a seguinte: fixação pelo álcool a 95°, ou acetona, por 24 horas; desidratação em álcool absoluto e clarificação em xilol, sendo todas as fases do trabalho realizadas na temperatura de 4° C; a seguir, inclusão dos tecidos em parafina a 56° C por 1 ou 2 horas, guardando-se os blocos a 4° C; os cortes foram feitos em micrótomo "Spencer", na espessura de 5 micra; na coloração dos cortes foi empregado o método direto da técnica de anticorpos fluorescentes (Goldwasser & Kissling 1958). Os cortes após passagem pelo xilol, pelo álcool e solução salina tamponada, quando secos, foram recobertos com o conjugado anti-rábico diluído conforme seu título; em seguida, as lâminas foram incubadas, em câmara úmida, à temperatura de 37° C por 1 hora (Fischman 1969, Sainte-Marie 1962); depois de retirados da estufa, os cortes foram lavados em solução salina tamponada, água destilada, fazendo-se a montagem com glicerina tamponada pH 7,4, com lâminulas apropriadas. O conjugado anti-rábico utilizado, procedente do BBL, correspondia à partida de número 9.041.906.

Para o exame dos esfregaços usou-se um microscópio Reichert Fluorpan, monocular, com condensador de campo escuro, tendo como fonte luminosa a lâmpada a vapor de mercúrio de alta pressão HB 50, filtro de excitação 1,5 mm UG1 e filtro de barragem 1 mm GG wratten foil 2A + 4 mm GG 13.

Foram examinados, ainda, os cérebros normais de 2 camundongos, 1 cão e 1 bovino, que funcionaram como testemunhas.

RESULTADOS

Os tecidos submetidos à embebição em parafina correspondiam a tecidos de animais infectados pelo vírus da raiva.

Melhor visualização do antígeno viral rábico foi obtida com a fixação dos tecidos em acetona em lugar do álcool a 95°.

O exame dos cortes de tecidos que, após a coloração por imunofluorescência, revelaram presença de antígeno viral rábico, concordaram com os exames anteriormente realizados em coloração de impressões de material fresco por imunofluorescência pelo método direto, inoculação em camundongos e pesquisa de corpúsculos de Negri, nos casos positivos de sistema nervoso central.

¹ Aceito para publicação em 23 mai. 1973.

² Veterinário da Seção de Virologia do Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul (IPEACS), Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, e bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq).

³ Chefe da Seção de Virologia do IPEACS, Regente da Disciplina de Virologia do Departamento de Biologia Vegetal, do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, e bolsista do CNPq.

No caso do cão, em que além do cérebro, e das glândulas salivares foram examinados o pulmão, fígado, baço, coração, rim e bexiga, foram obtidos resultados positivos no sistema nervoso central, glândulas salivares e pulmão. O baço, fígado, coração, rim e bexiga deram resultado negativo, havendo perfeita concordância com a inoculação em camundongos e com o exame das impressões coradas por imunofluorescência.

O bovino, do qual além do sistema nervoso central e das glândulas salivares foram examinados o pulmão, fígado, baço, córnea e supra-renal, foram obtidos resultados positivos no sistema nervoso central, glândulas submaxilares, córnea e supra-renal. Resultado negativo verificou-se no pulmão, baço e fígado, concordando também, no caso anterior, com a inoculação em camundongos e o exame das impressões coradas por imunofluorescência.

Em todos os materiais examinados que deram resultado positivo, verificou-se maior riqueza de material fluorescente nas impressões de tecidos frescos do que nos cortes de material embebido em parafina. Houve uma única exceção, que foi a glândula submaxilar do bovino acima citado.

Os cortes de tecidos nervosos dos animais testemunhas apresentaram resultados negativos.

DISCUSSÃO

O exame de cortes de tecidos raivosos incluídos em parafina e submetidos ao método de imunofluorescência, apesar de seu resultado satisfatório, não cumpre a finalidade de um diagnóstico rápido. É mais uma boa técnica que pode ser usada no diagnóstico da raiva, prin-

cipalmente para os laboratórios que se limitam aos trabalhos de histopatologia da raiva, quer buscando a presença de corpúsculos de Negri por esfregaços, quer estudando as lesões por inclusão dos tecidos nervosos em parafina. Para estes laboratórios, a introdução da imunofluorescência é de grande valor, pela sua especificidade, mormente quando não ocorre a presença de corpúsculos de Negri, ou outras alterações que possibilitem o diagnóstico da raiva. Este método apresenta, ainda, a possibilidade de um estudo mais apurado da distribuição do vírus rábico nos tecidos, conforme demonstração de Fischman (1969).

Melhores resultados foram obtidos quando foi empregada a fixação dos tecidos pela acetona e não pelo álcool a 95° C.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos à Seção de Anatomia Patológica do IPEACS pela realização dos blocos de parafina e seccionamento dos tecidos em microtômo.

REFERÊNCIAS

- Fishman, H.R. 1969. Fluorescent antibody staining of rabies infected tissues embeded in paraffin. *Am. J. vet. Res.* 30(71): 1213-1221.
- Goldwasser, R.A. & Kissling, R.E. 1958. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 98(2):219-223.
- Sainte-Marie, G. 1962. A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem.* 10:250-256.
- Silva, R.A.da, Silva, N.M.da & Guimarães, R.S. 1971. A utilização do método de imunofluorescência comparativamente com os métodos histoquímico e biológico no diagnóstico da raiva. *Zoonosis* 13(2):63-65.

ABSTRACT.- Silva, N.M.da; Silva, R.A.da [Diagnosis of rabies by fluorescent antibody staining of rabies infected tissues embedded in paraffin.]. Diagnóstico da raiva pela técnica de imunofluorescência em cortes de tecidos incluídos em parafina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* (1973) 8, 99-100 [Pt, en] IPEACS, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, Brazil.

The brains of three mice experimentally inoculated with rabid "Pasteur" fixed virus strain and of eleven dogs and six bovines naturally infected with rabies, were examined using the Sainte-Marie's Technique for fixation and paraffin embedding tissues and employing the fluorescent antibody direct staining method.

The rabies virus antigen was identified in the brain and cerebellum from all the animals studied and in the salivary gland of six of the dogs and three of the bovines.