

TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA A AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-RÁBICOS EM SOROS DE BOVINOS

I — Adaptação da técnica

Masaio Mizuno ISHIZUKA *
Omar MIGUEL *
Dalton França BROGLIATO **

RFMV-A/1f

ISHIZUKA, M. M. et al. — *Técnica de imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos. I — Adaptação da técnica.* Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 11: 139-45, 1974.

RESUMO: A adaptação da técnica de IFRA para soros de bovinos, foi conseguida à modificação da prova utilizada para soros humanos, devido ao fato da membrana dos neurônios representar uma barreira aos anticorpos bovinos.

Essa dificuldade foi facilmente superada pelo tratamento de decalques de corno de Amonn de cães sabidamente raivosos, por uma solução hipotônica (0,15 M) de sacarose por 30 minutos a 37°C. Outras modificações foram: utilização de CVS a 40% para fins de neutralização dos anticorpos e o fracionamento de soro normal de bovino em coluna de DEAE-CELLULOSE.

UNITERMOS: Raiva*; Soro-neutralização (SV)*; Imunofluorescência indireta (IFRA)*.

I — INTRODUÇÃO

A soroneutralização (SN), não obstante considerada prova padrão para a pesquisa de anticorpos anti-rábicos (ATANASIU ⁴, 1967), apresenta várias limitações decorrentes da variabilidade apresentada pelos diferentes valores de DL₅₀ do vírus empregado, em diferentes provas para fins de titulação dos soros; do tempo prolongado necessário à leitura; do elevado nú-

mero de camundongos a utilizar; e da variabilidade individual da resistência de outros fatores de morbidade e mortalidade que podem dificultar a interpretação da prova.

Justifica-se, assim, a preocupação de diferentes pesquisadores na busca de outras técnicas capazes de determinar quantidades de anticorpos anti-rábicos no soro.

* Professor Assistente Doutor.

** Técnico de Laboratório.

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

KING et al.¹² (1965), ensaiaram a prova de soroneutralização "in vitro" avaliada pela prova de Imunofluorescência direta, mais precisamente, pela inibição da mesma para fins de titulação de soros humanos cujos resultados foram comparáveis a SN "in vivo".

BERNKOPH & NACHTINGAL⁵ (1943) estudaram a reação de Fixação de Complemento comparativamente à SN, com soros de cobaios imunizados contra a raiva. Embora os autores tivessem considerado a não existência de correlação entre os títulos de anticorpos, esta conclusão não é entretanto, sustentada por LIPTON & FREUND¹⁵ (1953) quando estudaram soros de cobaios e coelhos pelas mesmas provas. PEREIRA¹⁹ (1969), estudou a mesma relação, porém, com soros humanos.

THOMAS et al.²¹ (1963) realizaram trabalho pioneiro da adaptação da prova de Imunofluorescência indireta (IFRA) para a avaliação qualitativa de anticorpos anti-rábicos em soros humanos. A este trabalho pioneiro segue-se uma série de outros, mas sempre voltados à aplicação da prova em soros humanos. São exemplos, os trabalhos de LARSH¹³ (1965), LEFFINGWELL & IRONS¹⁴ (1965), GISPEN & SASTHOF¹⁰ (1965) e PECK¹⁸ (1966).

Em bovinos, entretanto, a literatura é omissa no que respeita ao emprego da IFRA para fins de terminação de anticorpos anti-rábicos. É possível que este fato se deva às características peculiares do soro de bovino, que pelo menos em relação a algumas provas como a Fixação de Complemento (RICE & CARPIERE²⁰ (1961), não se comporta igualmente aos soros humanos, de cobaios ou de coelho.

O estudo da imunidade anti-rábica apresenta grande interesse do ponto de vista teórico e prático, pois, ACHA¹ (1968) estima que nas Américas, morre aproximadamente, um milhão de bovinos em conse-

qüência à raiva, transmitida principalmente por morcegos hematófagos. Apresenta interesse o estudo do nível de imunidade, visto a prevenção da raiva em bovinos basear-se, fundamentalmente, na imunização ativa do suscetível. Tais estudos tem sido realizados em base à SN que apresenta os inconvenientes já citados.

O presente trabalho cuida da adaptação da prova de IFRA para a determinação de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos.

Adaptação da prova de Imunofluorescência Indireta

Nossas numerosas tentativas de aplicação da técnica de IFRA como descrita por THOMAS et al.²² (1963), já citado, para a pesquisa de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos não ofereceram resultados satisfatórios. De fato, conseguimos visualizar número diminuto de corpúsculos de Negri fluorescentes que não pareciam estar localizados no interior dos neurônios, embora os decalques de corno de Ammon de cão e de cérebro de camundongo infectados se revelassem ricos em corpúsculos, avaliados pela prova de imunofluorescência direta (ATANASIU³, 1966).

Procuramos indagar das razões deste comportamento e paralelamente testar os diferentes componentes da prova.

Empregando o mesmo antígeno e o mesmo conjugado, realizamos provas de inibição da imunofluorescência direta (ATANASIU³, 1966), utilizando, respectivamente, soros humano, de cão e de bovino ricos em anticorpos anti-rábicos, avaliados pela SN. A inibição foi conseguida nos dois primeiros casos, mas não com o soro bovino, indicando assim comportamento diverso deste em relação aos primeiros. Resolvemos então, empregar, como antígeno, não mais decalques de corno de Ammon de cão raivoso e de cérebro de camundongo infectado, mas sim, esfregaço de sus-

pensão de vírus fixo CVS. Neste caso, a inibição foi conseguida também com soro de bovino.

Realizando-se, então, com o mesmo antígeno, a prova de IFRA com os soros já mencionados, em todos os casos ela foi conseguida, tendo-se observado grande número de corpúsculos intensamente corados. Estas observações levaram-nos à hipótese de que, relativamente aos anticorpos anti-rábicos de bovinos, a membrana celular poderia representar uma barreira. Orientamo-nos no sentido de tratar os decalques de corno de Ammon de cão raivoso e de cérebro de camundongo infectado, por processos que pudessem lesar a parede celular e, assim, facilitar a reação antígeno anticorpo.

Os procedimentos empregados com corno de Ammon de cão morto por raiva e cérebro de camundongo infectado com vírus de rua a fim de preparar as lâminas para a prova IFRA com soros de bovino contendo anticorpos anti-rábicos foram:

a) trituração com solução salina e centrifugação a 1.500 r p m, preparando-se os esfregaços a partir do sobrenadante. Os resultados não foram satisfatórios em virtude da dificuldade na preparação de decalques finos e ricos em corpúsculos para atender a exigência da técnica de fluorescência;

b) congelação a -20°C e descongelação a 37°C e 45°C segundo diferentes intervalos de tempo. Obtivemos resultados variáveis quanto à intensidade de fluorescência;

c) baseando-nos na referência de ALF-FREY² (1960) de que a solução de sacarose nas concentrações entre 0,05 e 0,25 M é hipotônica para células, sendo capaz de romper a membrana celular, tratamos então os decalques com solução de sacarose 0,15 M antes de utilizá-los na IFRA.

Os resultados obtidos quanto à intensidade de fluorescência foram comparáveis aos que normalmente se observam pelo método de imunofluorescência direta e facilmente reproduzíveis. Tentativas realizadas com diferentes temperaturas e tempos de exposição levaram-nos a selecionar 37°C e 30 minutos como condições ideais para a ação da sacarose sobre os preparados.

Os resultados obtidos com esta última alternativa conduziu-nos a selecioná-la para o prosseguimento do trabalho.

Para o fracionamento dos soros a fim de se obter a gama globulina de bovino utilizamos a técnica de cromatografia dos soros em coluna de DEAE-CELLULOSE como referido por BUTLER⁸ (1969) e segundo técnica de KABAT & MAYER¹¹ (1961) em lugar da precipitação com solução saturada de sulfato de amônio (CAMARGO⁹, 1967).

A suspensão de vírus fixo CVS para a neutralização dos anticorpos anti-rábicos presentes nos soros a serem testados, foi utilizada na concentração de 40%, pois a 20% como recomendada por THOMAS²¹ et al. (1963), resultaram apenas neutralizações parciais.

Fundamentalmente, as modificações introduzidas na técnica de THOMAS et al.²¹ (1963), que permitiram a pesquisa e determinação de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos mediante a prova de IFRA foram: tratamento dos decalques de corno de Ammon de cães com solução de sacarose 0,15 M; suspensão de CVS a 40% e fracionamento dos soros de bovino normal pela cromatografia em coluna DEAE-CELLULOSE.

Para a coloração de fundo utilizamos solução de Azul de Evans, segundo NICHOLS¹⁷ (1962). Preparamos as antiglobulinas de bovino pela imunização de coelhos segundo MOLLISON et al.¹⁶ (1966).

Resumimos a seguir a técnica, como por nós preconizada.

II — MATERIAL E METODOS

Antígeno:

Os decalques em número de 8 por lâmina, foram preparados a partir de corno de Ammon de cães sabidamente raivosos, obtidos junto ao Instituto Pasteur de São Paulo, e como testemunhas, o mesmo material originário de cães normais, de igual procedência. Antes da sua utilização como antígeno, o material era submetido à prova de Imunofluorescência direta segundo ATANASIU³ (1966), para fins de confirmação de sua positividade e avaliação da riqueza do material em corpúsculos de Negri. Os decalques foram inativados pela radiação durante 5 minutos e em seguida tratados pela sacarose 0,15 M a 37°C, durante 30 minutos, ao fim dos quais as lâminas estavam prontas para receber os soros de bovinos a serem testados.

Diluyente:

As suspensões de cérebro normal de camundongo (CN) e de CVS, foram preparadas segundo ATANASIU³ (1966) sendo as concentrações de 20% e 40% respectivamente, sendo que o título do CVS foi de 10^{-6,3} DL₅₀/0,03 ml.

Conjugado:

A gama globulina de bovino normal foi obtida segundo técnica de KABAT & MAYER¹¹ (1961) para o fracionamento em coluna de DEAE-CELLULOSE em tampão fosfato 0,005 M e pH 8,0, sendo a pureza da fração constatada pela técnica de Imunoelektroforese. Valemo-nos de coelhos para a obtenção de anti-gama-globulina obedecendo-se o esquema referido por CAMARGO⁹ (1967). Acompanhou-se a resposta imunitária desses animais empregando-se a técnica de precipitação em gel de ágar como descrito por BEUTNER⁷

(1965). As antiglobulinas foram marcadas com Isotiocianato de fluoresceína BBL, Isômero I, cristalino, cromatograficamente puro, lote 9101581, para fins de marcação pelo método lento, retirando-se o excesso de fluorocromo não conjugado por gel filtração em coluna de Sephadex G 25, segundo descrito por CAMARGO⁹ (1967). O conjugado apresentou as seguintes características:

— Isotiocianato de fluoresceína (F)	9.5 mg%
— Proteína (globulina) (P) ..	2.5 g%
— Relação F/P	3.8×10 ⁻³

As dosagens foram realizadas segundo BEUTNER⁶ (1971).

Atividade fluorescente inespecífica:

Os decalques de corno de Ammon de cães raivosos foram tratados com diferentes diluições do conjugado (1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32) não se observando coloração inespecífica em nenhum dos decalques tratados.

Atividade fluorescente específica:

Decalques preparados a partir de corno de Ammon de cães normais e raivosos foram tratados com soros reagentes e não reagentes a SN (ver técnica da reação) diluídos a 1:5. Realizamos diluição dobrada do conjugado a partir do puro (1:1 a 1:16) e a cada diluição foram adicionadas suspensão de cérebro normal de camundongo e solução Azul de Evans a 1:4.000 na proporção de 1 parte de conjugado diluído, 3 partes de suspensão de cérebro normal e quatro partes de Azul de Evans. Resultou intensa fluorescência nos decalques positivos quando o conjugado diluído até 1:128 e ausência de fluorescência nos decalques testemunhas. O conjugado foi utilizado na diluição de 1:16.

ISHIZUKA, M. M. et al. — Técnica de imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos. I. Adaptação da técnica. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11:139-45, 1974.

TECNICA DA REACAO

Os soros a ensaiar foram diluídos paralelamente em suspensão de CN e de CVS na razão 5, de 1:5 a 1:625 e incubados a 37°C por 30 minutos.

Simultaneamente, foram preparados decalques, recobertos por solução 0,15 M de sacarose e incubados a 37°C durante 30 minutos. Ao fim deste período, formou-se uma película de sacarose sobre os mesmos.

Distribuíram-se as diluições dos soros sobre os decalques bastando uma lâmina positiva e uma negativa para cada soro, pois cada lâmina comportava 8 decalques.

Os preparados foram incubados por 30 minutos a 37°C, após os quais lavados duas vezes em salina tamponada (NaCl 0,15 M fosfatos 0,01 M, pH 7.2). Distribuiu-se sobre os decalques, o conjugado devidamente diluído e em quantidade suficiente para recobrir os preparados. Incubavam-se novamente a 37°C durante 30 minutos. Repetiam-se as lavagens como acima referido. Secavam-se as lâminas e montavam-se em glicerina tamponada (9 partes de glicerina pura e uma parte de solução tam-

pão carbonato — bicarbonato 0,5 M e pH 8.5). As leituras foram realizadas ao microscópio de fluorescência Zeiss, com filtro excitador UGI e barreira 43 Zeiss.

Soros testemunhas:

A cada titulação incluía-se um soro reagente e um não reagente às provas de SN e IFRA.

Preparados testemunhas:

Examinavam-se, sistematicamente, em paralelo, preparados testemunhas de decalque de corno de Ammon de cão normal.

Reprodutibilidade da reação:

Para aquilatarmos da reprodutibilidade da prova, valemo-nos de cinco soros apresentando reatividades diversas à prova de SN (ATANASIU³, 1966). Dentre eles foi incluído um soro não reagente. Cada um dos soros foi dividido em 5 (cinco) alíquotas e codificadas para permitir leitura cega.

Os resultados obtidos estão na tabela I.

TABELA I

Titulos de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos medidos pela prova de IFRA. São Paulo, 1972.

n.º do soro n.º da replicação	03	08	09	51	10
	1. ^a	125	625	25	25
2. ^a	125	125	25	5	—
3. ^a	125	625	5	5	—
4. ^a	125	625	25	25	—
5. ^a	125	625	25	5	—

III — DISCUSSÃO

A adaptação da prova de THOMAS et al.² (1963), para a pesquisa de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos, implicou na introdução de algumas alterações, notadamente, no emprego como antígeno de decalques de corno de Ammon de cão morto por raiva. Também, encontrou-se o tratamento prévio dos preparados com solução de sacarose 0,15 M concentração esta hipotônica para células conforme ALFFREY² (1960), como etapa indispensável ao sucesso da prova.

Os resultados obtidos com este tratamento sugerem, embora as razões intrínsecas do fenômeno não tenham sido estudadas, que a imunoglobulina bovina comporta-se

diferentemente das demais imunoglobulinas testadas de outras espécies, quanto à capacidade de atravessar a membrana celular.

Relativamente à suspensão de vírus fixo CVS, utilizado para fins de neutralização dos anticorpos anti-rábicos de soros bovinos, houve a necessidade de se aumentar a concentração de 20% para 40%, posto que, com a primeira concentração, persistia nas preparações testemunhas, a presença de fluorescência, não obstante a suspensão de CVS apresentasse elevado título ($10^{-6.3}$ DL₅₀/0,03 ml).

Como demonstram os resultados da Tabela 1, a prova apresenta boa reprodutibilidade, não se observando diferenças maiores do que aquelas correspondentes a uma diluição.

RFMV-A/16

ISHIZUKA, M. M. et al. — *Indirect immunofluorescence rabies antibody technique for bovine serum. I — Technique adaptation.* *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11:139-45, 1974.

SUMMARY: *The adaptation of the IFRA technique for bovine serum was consequent to the modification of the technique used in human serum, because the nervous cells membrane actuated as a barrier to the bovine antibodies. This difficult was eliminated by the treatment of the Amonn horn smears from dogs with rabies, with a hipotonic (0,15 M) solution of sacharose during 30 minutes for 37°C.*

Others modifications were: the use of 40% CVS suspension for the antibodies neutralization and the fractionation of bovine normal serum through DEAE-CELLULOSE column.

UNITERMS: *Rabies*; Serum-neutralization*; Indirect immunofluorescence rabies antibody technique*.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHA, P. N. — Epidemiologia de la rabia bovina parálitica transmitida por los quulopteros. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 64(5):411-29, 1968.
2. ALFFREY, V. — The isolation of cellular components. In: BRACKET, J. & MIRSKY, A. E., ed. — *The cell*. New York, Academic Press, 1960, v. 1, p. 193-290.
3. ATANASIU, P. — Laboratory techniques in rabies. Geneva, World Health Organization, 1966. [Monograph Series, n.º 23].

ISHIZUKA, M. M. et al. — Técnica de imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos. I. Adaptação da técnica. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11:139-45, 1974.

4. ATANASIU, P. — Titrage des anticorps rabiques pratiqué sur les serums humains. *Bull. Off. int. Epizoot.*, 67 (3/4):383-7, 1967.
5. BERNKOPF, H. & NACHTIGAL, D. — Complement fixation test with sera animals immunized with rabies virus. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 95:1176-99, 1943.
6. BEUTNER, E. H. et al. — Field trials by ten laboratories of six commercial conjugate prepared from anti-sera to human IgG. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 177:361-403, 1971.
7. BEUTNER, E. H. et al. — A new fluorescent antibody method: mixed antiglobulin immunofluorescence-staining. *Nature (Lond.)*, 208:353-5, 1965.
8. BUTLER, J. E. — Bovine immunoglobulin: a review. *J. Dairy Sci.*, 52 (12):1895-905, 1969.
9. CAMARGO, M. E. — *Introdução às técnicas de imunofluorescência*. São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, 1967. [Apostila]
10. GISPEN, R. & SASTHOF, B. — Neutralizing and fluorescent antibody response in man after antirabies treatment with suckling rabbit brain vaccine. *Arch. ges. Virusforsch.*, 15(3):377-86, 1965.
11. KABAT, E. A. & MAYER, M. M. — Gamma (gammas) globulin. In: *Experimental immunochemistry*. 2nd ed. Springfield, C. C. Thomas, 1961. p. 760-77.
12. KING, D. A. et al. — A rapid quantitative "in vitro" serum neutralization test for rabies antibody. *Canad. vet. J.*, 6(8):187-93, 1965.
13. LARSH, S. E. — Indirect fluorescent antibody and serum neutralization response in pre-exposure profilaxis against rabies. *Ann. intern. Med.*, 63(6):955-64, 1965.
14. LEFFINGWELL, L. & IRONS, J. U. — Rabies antibodies in human serum titrated by the indirect FA method. *Publ. Hlth. Rep. (Wash.)*, 80(11):999-1004, 1965.
15. LIPTON, M. M. & FREUND, J. — The formation of complement fixing and neutralizing antibodies after infections of inactivated rabies virus with adjuvants. *J. Immunol.*, 71:98-109, 1953.
16. MOLLISON, P. L. et al. — Production of antibody against purified human globulin in rabbits, goats, sheep and horses. *Immunology*, 10:271-9, 1966.
17. NICHOLS, R. L. & McCOMB, D. E. — Immunofluorescent studies with trachoma and related antigens. *J. Immunol.*, 89:545-54, 1962.
18. PECK, F. B. (Jr.) — The detection of human rabies antibody by the indirect fluorescence test. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RABIES, Talloires, 1965. *Proceedings*. Basel, Karger, 1966. v. 1, p. 201-6.
19. PEREIRA, O. A. C. — Contribuição ao estudo da imunidade anti-rábica. Sua avaliação por métodos serológicos. São Paulo, 1969. [Tese — Faculdade de Medicina da USP].
20. RICE, C. E. & CARRIERE, J. — The effect of unheated normal bovine on the complement-fixing activity of heat inactivated bovine antiserum with homologous antigen. *J. Immunol.*, 87(6):665-74, 1961.
21. THOMAS, J. B. et al. — Evaluation of indirect fluorescent antibody techniques for detection of rabies antibody in human sera. *J. Immunol.*, 91:721-3, 1963.

Recebido para publicação em 28-8-74

Aprovado para publicação em 29-8-74