

IMUNOFLORESCÊNCIA REALIZADA EM CÉREBROS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM VÍRUS RÁBICO - CEPA CVS, EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DECOMPOSIÇÃO

Elizabeth Juliana Ghiuro VALENTINI (1), Avelino ALBAS (1), Vera Lúcia MENDES AUGUSTO (1)
& Fumio Honma ITO (2)

RESUMO

O teste de imunofluorescência (IF) foi avaliado na detecção de vírus rábico presente em cérebros de carcaças de camundongos infectados com vírus da cepa CVS, os quais foram conseguidos através de uma combinação de tratamentos, em que se variaram as temperaturas (4,25 e -20°C) e o tempo de armazenamento.

No teste de IF realizado com impressões cerebrais de carcaças que haviam sido submetidas à temperatura de 25°C por 12 -18 h, houve maior dificuldade de visualização imediata dos corpúsculos de inclusão, enquanto que nos materiais conservados a 4°C por até 48 h, as inclusões foram facilmente reconhecidas. Carcaças mantidas a -20°C mantiveram-se viáveis à identificação pela IF mesmo após terem sido armazenadas por 720 h quando foram feitas as últimas observações. Em carcaças mantidas a 25°C por 10 h, com tratamento posterior a 4 e -20°C, o antígeno rábico não pode ser identificado através da IF, em consequência da decomposição das carcaças que ocorrem, respectivamente, após 10 e 24 h. Recomenda-se, portanto, empregar o teste de IF, em caráter de rotina, no controle de qualidade da vacina contra a Raiva, no que diz respeito a prova de vírus residual (teste de verificação da inativação viral), de vez que ele permite esclarecer mortes assintomáticas ocorridas em animais inoculados com a vacina, durante o período de observação da prova (21 dias), bem como evitar a sua repetição quando essas mortes ocorrem, o que representa considerável economia de tempo.

UNITERMOS: Raiva; Imunofluorescência; Vírus cepa CVS; Camundongos; Decomposição cadavérica.

INTRODUÇÃO

Dentre os diversos usos do camundongo albino, na Raiva, além do diagnóstico¹, incluem-se a produção³ e controle de vacinas inativadas^{5,11}. Neste aspecto, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), órgão oficial do Ministério da Saúde, responsável pelo controle e liberação de vacinas contra a Raiva de uso humano no Brasil, utiliza-se desse sistema biológico para o teste de verificação da inativação viral (teste do vírus residual).

O teste consiste na inoculação de 0,03 ml. da vacina em prova, pela via i.c., em 24 camundongos que, em seguida, são observados por um período de, pelo menos, 21 dias. Se a mesma apresentar vírus não inativados, os camundongos adoecerão com sinais de Raiva¹⁰. Para que a prova seja válida, devem ser considerados apenas os camundongos mortos em consequência da Raiva.

Neste sentido, a observação de sinais e sinto-

(1) Instituto Butantã, Seção de Vírus Neurotrópicos.
Av. Vital Brasil, 1500. CEP: 05504 São Paulo, SP, Brasil.

(2) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnia da Universidade de São Paulo. Av. Corifeu de Azevedo Marques, 2720 - Vila Lageado. CEP 05340 São Paulo, SP, Brasil.

mas nos animais inoculados assume um papel importante que não deve ser negligenciado⁷. Na prova, as mortes ocorridas até o 4º dia pós-inoculação não são consideradas. Por outro lado todos os animais mortos entre o 5º e 21º dias de observação são confirmados pela prova de imunofluorescência direta visando a pesquisa do antígeno rábico no material cerebral. Há, porém, situações em que a morte ocorre subitamente, próximo do período final de observação, sem manifestação dos sintomas de Raiva. A princípio, em tais circunstâncias, o teste deve ser repetido.

No Instituto Butantã, a Seção de Vírus Neurotrópicos vem acumulando, há muito tempo, experiência na produção e controle de qualidade da vacina contra a Raiva dado o volume de trabalho e procura da vacina. No controle do vírus residual da vacina a granel ou ampolada há necessidade de observação dos camundongos inoculados. Os animais mortos são recolhidos em leituras diárias e os cérebros são submetidos à prova de imunofluorescência direta. Ocorre que, em certas ocasiões, já enfrentamos problemas sob o ponto de vista técnico e administrativo que, eventualmente trouxeram dificuldades tais como impactos no decorrer da prova devido aos fins de semana prolongados nos quais as carcaças dos camundongos eram encontradas em adiantado estado de putrefação, obviamente, obrigando a repetição da prova de vírus residual.

Em tais situações, muitas vezes, a prova de imunofluorescência apresenta resultados negativos em contraste com sinais e sintomas compatíveis com Raiva observados antes da morte dos animais. A falta de dados experimentais não permite a correta avaliação destes resultados.

Os resultados discrepantes entre a prova de imunofluorescência e a manifestação clínica da doença, nos camundongos, poderiam ser decorrentes do estado de conservação do material, face à permanência prolongada das carcaças no interior das caixas, onde a temperatura interna é relativamente elevada. **WINKLER & ADAMS**¹³, entretanto, afirmaram que a fluorescência do antígeno rábico pode ainda ser verificada em materiais procedentes de animais raivosos e já em adiantado estado de putrefação, mesmo que as provas de inoculação ou de **SELLERS**⁹ resultem negativas. **WACHENDÖRFER** (1966)¹², por sua vez, ao investigar o problema relacionado com o uso de materiais putrefeitos para o diagnós-

tico da Raiva, verificou maior freqüência de resultados discrepantes entre a prova de inoculação em camundongos e a de imunofluorescência, quando do uso de materiais comprovadamente putrefeitos, comprometendo o diagnóstico.

Todavia, de acordo com **KISSLING**⁶, não se pode prever o momento em que cada um destes testes começa a apresentar falhas em decorrência da decomposição do material cerebral.

Diante dos fatos mencionados, a presente pesquisa teve por objetivo verificar experimentalmente o efeito do estado de conservação das carcaças de camundongos infectados pelo vírus rábico e a sua possível interferência na prova de imunofluorescência. Basicamente, procurou-se simular as condições encontradas na prova de vírus residual. Os camundongos mortos após a inoculação do vírus rábico foram submetidos a diferentes condições de conservação - tempo e temperatura - e os cérebros foram em seguida, avaliados pela prova de imunofluorescência direta, obedecendo uma seqüência de intervalos pré-determinados, na tentativa de se estabelecer o momento em que a prova deixa de funcionar eficazmente, em decorrência da decomposição tissular.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais - Para a obtenção de cérebros positivos para a Raiva, foram utilizados 250 camundongos suíços albinos, com peso entre 11 e 14 g, procedentes do biotério do Instituto Butantã.

Vírus - Utilizou-se o vírus rábico fixo, cepa CVS (Challenge Vírus Standard), amostra 31/2, fornecido pelo Centro Panamericano de Zoonoses (CEPANZO), mantido em camundongos por duas passagens intracerebrais, com título aproximado de $10^{7.3}$ DL₅₀/0,03 ml. O inóculo utilizado foi constituído por uma suspensão cerebral deste vírus diluído a $10^{-3.0}$.

Conjugado anti-rábico - O conjugado anti-rábico imunofluorescente foi preparado a partir de soro hiperimune de equino². As técnicas empregadas para fracionamento salino e conjugação com isotiocianato de fluoresceína (FITC - SIGMA) segundo **LARGHI** (1975)⁸, revelaram título final de 1:50.

Diluyente - O diluyente empregado para a diluição do conjugado constituiu-se de uma suspensão a 20% de cérebro normal de camundongo em água bidestilada contendo 2% de soro normal equino, acrescido de 0,2 mg/ml de estreptomomicina e 200 UI/ml de penicilina.

Reação de Imunofluorescência (IF) - Foi empregada a técnica preconizada por **GOLDWASSER & KISSLING** (1958)⁴, sendo a leitura das lâminas efetuada em microscópio binocular marca Wild Leitz, modelo Leitz Wetzlar, equipado com lâmpada HBO-200, e com um conjunto de filtros excitadores e de barreira.

Procedimentos - Os camundongos foram inoculados pela via intracerebral com 0,03 ml de uma suspensão de vírus CVS e todos os animais que apresentaram sinais característicos da Raiva foram sacrificados no 5º dia pós-inoculação, já em estado agônico, sendo as carcaças estocadas em variadas temperaturas, conforme indicado abaixo.

- a 25°C por 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 48, 72 e 96 horas.

- a 25°C por 10 h, e posteriormente a 4°C por 8, 10, 12, 14, 16, 24, 48 e 72 horas.

- a 25°C por 10 h, e posteriormente a -20°C por 12, 14, 16, 24, 48 e 72 horas.

- a 4°C por 24, 48, 54, 72 e 96 horas.

- a -20°C por 24, 48, 72, 96, 120, 240 e 720 horas.

As carcaças submetidas à temperatura ambiente (25°C) do infectório permaneceram nas mesmas caixas ocupadas pelos camundongos antes do sacrifício, com cama, água e ração. As carcaças submetidas às temperaturas de 4°C e -20°C foram acondicionadas em papel alumínio, identificadas e armazenadas em seguida. Para o descongelamento, as carcaças permaneceram em temperatura ambiente por 1 hora, sendo em seguida processadas para a prova de IF.

Na prova de IF foram utilizados cinco cérebros para cada intervalo de tempo, tomando-se duas impressões para cada cérebro em análise; a intensida-

de de fluorescência por lâmina foi graduada de 1+ a 4+.

RESULTADOS

Na tabela 1 estão apresentados os resultados da prova de IF realizada em cérebros obtidos de carcaças de camundongos armazenados sob diferentes condições de temperatura, ou seja 25, 4 e -20°C, por períodos de tempo que variaram de 6 a 720 horas. Nos cinco cérebros de carcaças que haviam permanecido a 25°C, os corpúsculos com intensidade máxima de fluorescência foram observados até 10 h; após 12 h a intensidade foi decrescendo de 2+ para 1+ e, decorridas 18 h de armazenamento nesta temperatura, 3/5 (60%) dos resultados foram negativos à prova. Nos intervalos subsequentes, isto é, de 20 até 96 h, os resultados foram 100% negativos ao teste. Quanto às carcaças mantidas a 4°C, decorridas 48 h de armazenamento, a intensidade máxima de fluorescência foi detectada em 5/5 (100%) dos materiais examinados. Entretanto, com 54 h, 3/5 (60%) apresentaram-se negativos e os dois cérebros positivos apresentaram os seus corpúsculos fracamente fluorescentes (1+). À partir de 72 h, os resultados foram negativos em 100% dos materiais examinados. Por outro lado, os cérebros obtidos de carcaças congeladas a -20°C apresentaram-se viáveis à prova, com intensidade de 4+, mesmo tendo sido armazenados por 720 h (30 dias).

Os resultados de prova de IF, obtidos com cérebros de carcaças mantidas a 25°C por 10 h, e posteriormente armazenadas a 4°C ou a -20°C por períodos de tempo variados, estão resumidos na tabela 2. Decorridas 8 h, a reação de imunofluorescência observada nos cérebros de carcaças mantidas a 4°C apresentou corpúsculos fracamente fluorescentes, com intensidade de 2+. No intervalo seguinte, isto é, decorridas 10 h, 5/5 (100%) dos materiais foram negativos à prova, e, após 12 h, a presença de corpúsculos com intensidade 1+ foi observada em uma lâmina (1/5 ou 20%). Nos intervalos subsequentes, até 72 h, todos os materiais examinados foram negativos.

Quanto aos cérebros correspondentes às carcaças mantidas a 25°C e em seguida submetidas a -20°C, nos intervalos compreendidos entre 12 e 16 h, as inclusões foram evidenciadas com máxima intensidade de fluorescência (4+) em 100% dos materiais examinados. Entretanto, com 24 h, 3/5

(60%) das lâminas apresentaram intensidade 1+, e 2/5 (40%) com intensidade 2+. Nos períodos subsequentes, os corpúsculos de inclusão não foram detectados.

Em relação ao estado de conservação, as car-

caças que haviam permanecido a 25°C apresentavam-se em adiantado estado de decomposição, tendo o processo de retirada do cérebro e a obtenção das impressões em lâminas de microscopia sido comprometidos, em consequência da decomposição cadavérica.

Tabela 1 - Imunofluorescência realizada em cérebros de carcaças de camundongos inoculados com vírus rábico cepa CVS e submetidos a 25, 4 e -20°C, por diferentes intervalos de tempo.

Tempo (Hora)	Temperatura 25°C		4°C		-20°C	
	Resultado Imunofluorescência Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
6	5/5* ++++**	0/5	nr	nr	nr	nr
8	5/5 ++++	0/5	nr	nr	nr	nr
10	5/5 ++++	0/5	nr	nr	nr	nr
12	5/5 ++	0/5	nr	nr	nr	nr
14	5/5 +	0/5	nr	nr	nr	nr
16	5/5 +	0/5	nr	nr	nr	nr
18	2/5 +	3/5	nr	nr	nr	nr
20	0/5	5/5	nr	nr	nr	nr
24	0/5	5/5	5/5 ++++	0/5	5/5 ++++	0/5
48	0/5	5/5	5/5 ++++	0/5	5/5 ++++	0/5
54	0/5	5/5	2/5 +	3/5	nr	nr
72	0/5	5/5	0/5	5/5	5/5 ++++	0/5
96	0/5	5/5	0/5	5/5	5/5 ++++	0/5
120	nr	nr	nr	nr	5/5 ++++	0/5
240	nr	nr	nr	nr	5/5 ++++	0/5
720	nr	nr	nr	nr	5/5 ++++	0/5

nr - Não realizado

** - Gradação de intensidade da fluorescência específica: + ++ +++ ++++

* - N° total de lâminas positivas à prova de imunofluorescência/total de lâminas observadas.

Tabela 2 - Imunofluorescência realizada em cérebros de carcaças de camundongos inoculados com vírus rábico fixo cepa CVS e mantidos à temperatura ambiente (25°C) por 10 h e posteriormente acondicionados a 4 e -20°C.

Tempo (Hora)	Temperatura 4°C		-20°C	
	Resultado Imunofluorescência Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
8	5/5* +++*	0/5	nr	nr
10	0/5	5/5	nr	nr
12	1/5 +	4/5	5/5 ++++	0/5
14	0/5	5/5	5/5 ++++	0/5
16	0/5	5/5	5/5 ++++	0/5
24	0/5	5/5	3/5 + 2/5 ++	0/5
48	0/5	5/5	0/5	5/5
72	0/5	5/5	0/5	5/5

nr - Não realizado

** - Gradação de intensidade da fluorescência específica:

+ ++ +++ +++++

* - N° total de lâminas positivas à prova de imunofluorescência/total de lâminas observadas.

DISCUSSÃO

A prova de IF apresenta alta sensibilidade e especificidade, porém, a sua utilização em materiais em adiantado estado de decomposição pode comprometer o resultado^{6,8}.

Os laboratórios que oferecem serviço de diagnóstico para Raiva, frequentemente recebem materiais suspeitos que são muitas vezes mantidos em condições inadequadas de conservação. Mesmo assim, o diagnóstico ainda é possível⁶. De fato, WINKLER & ADAMS¹³ afirmaram que a prova de IF pode evidenciar a presença de antígeno rábico mesmo em materiais já putrefeitos. Os resultados obtidos na presente pesquisa, entretanto, não corroboraram totalmente com os achados de outros autores, possivelmente pelo fato da leitura da IF ter sido limitada ao parâmetro da detecção dos corpúsculos de inclusão. Embora o critério de avaliação da IF seja subjetivo, os corpúsculos de inclusão observados nesta pesquisa estavam mais dificilmente reconhecíveis nos cérebros de carcaças que haviam permanecido a 25°C por 12-18 ho-

ras. Foi observado também que, uma vez iniciado o processo de decomposição, o tratamento posterior a 4°C ou a -20°C não apresentou vantagem prática, pois os cérebros já se encontravam alterados, impossibilitando a obtenção de impressões cerebrais adequadas para a prova de IF.

Na prova de vírus residual, os animais inoculados devem ser cuidadosamente observados obrigatoriamente, no mínimo, em duas leituras diárias e um plantão noturno. Para evitar a repetição da prova de vírus residual, que tem a duração de 21 dias, a realização do teste de IF é, pois, recomendável. Desta forma, este trabalho experimental apresenta evidências úteis para todos os laboratórios do país que produzem e conseqüentemente realizam a prova de vírus residual em vacinas contra a Raiva inativadas, pois, a prova de IF constitui-se em método adicional de controle.

Ainda nossos resultados fornecem subsídios para os laboratórios especializados de todo o país que recebem material em variadas condições de conservação para serem realizadas as pesquisas do vírus rábico.

SUMMARY

Fluorescent antibody test for detection of rabies virus in brain smears of CVS-infected mice at different stages of decomposition.

The efficiency of the fluorescent antibody (FA) test in detecting rabies virus antigen in decomposed specimens was evaluated in simulated conditions of the safety test recommended for the assessment of residual virus in inactivated rabies vaccines.

The CVS-infected mice were submitted to different treatments combining time and temperature in order to cause different stages of carcass decomposition and, the FA test was carried out sequentially at pre-determined time intervals.

For the materials stored at 25°C, greater difficulties for prompt recognition of the inclusion bodies were found after 12 - 18h, whilst the specimens maintained at 4°C, the inclusions were easily visualized for up to 48h. Brain smears of carcasses kept at -20°C were suitable for adequate identification after 720 h of storage.

In carcasses that had been maintained at 25°C for 10 h with additional storage at 4 or -20°C, rabies antigenicity could not be detected, respectively after 10 and 24 h, due to tissue decomposition.

The authors recommend that the FA test, when applied as an additional tool for the control of the safety test of inactivated rabies vaccine using mice, care must be taken in order to avoid the use of decomposed materials.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à DR^a EDDA DE RIZZO, Diretora do Serviço de Virologia do Instituto Butantã, pela discussão e revisão do manuscrito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATANASIU, P. - Animal inoculation and the Negri body. In: BAER, G.W. - **The natural history of rabies**. New York, Academic Press, 1975. v.1, p.373-400.
2. 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 production of antiserum of human use. *J.biol.Stand.* 16:27-32, 1988.
3. FUENZALIDA, E. & PALACIOS, R. - Un metodo mejorado en la preparación de la vacuna antirrábica. *Bol. Inst.bact.Chile*, 8:3-10, 1955.
4. GOLDWASSER, R.A. & KISSLING, R.E. - Fluorescent antibody staining of street and fixed virus antigens. *Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.)*, 98:219-223, 1958.
5. HABEL, K. - General consideration in safety and potency testing. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H. - **Laboratory techniques in rabies**, 3rd. ed. Geneva, World Health Organization, 1973. p.271-275 (WHO Monogr.Ser.23).
6. KISSLING, R.E. - The fluorescent antibody test in rabies. In: BAER, G.M. - **The natural history of rabies**. New York, Academic Press certo. v.1,p.401-416.
7. KOPROWSKI, H. - Prueba de inoculación al raton. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H. - **La rabia: tecnicas de laboratorio**. 3.ed. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1976. p.88-97 (OMS Monogr. Ser.nº 23).
8. LARGHI, O.P. - Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia. Ramos Mejia, Buenos Aires, Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS, 1975. (nota tecnica nº 8).
9. LÉPINE, P. - Diagnóstico histopatológico. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H. - **La rabia: tecnicas de laboratorio**. 3.ed. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1976.p.58-74 (OMS Monogr. Ser.nº 23).
10. MANUAL de Produção e Controle de Vacina Contra a Raiva. Brasília, Ministério da Saúde, 1988.
11. SELIGMANN, E.B. - The NIH test for potency. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H. - **Laboratory techniques in rabies**. 3rd. ed.Geneva, World Health Organization, 1973.p.279-286 (WHO Monogr.Ser.23).
12. WACHENDÖRFER, Von G. - Fluoresceinmarkierte Antikörper in der Diagnostik von Viruskrankheiten, dargestellt am Modell der Tollwut. *Dtsch. tierärztl.Wschr.*,73:446-452, 1966.
13. WINKLER, W.G. & ADAMS, D.B. Apud KISSLING, R.E. - The fluorescent antibody test in rabies. In: BAER, G.M. - **The natural history of rabies**. New York, Academic Press, 1975. v.1, 401-416.

Recebido para publicação em 3/9/1990
Aceito para publicação em 16/4/1991