

CAMILLO CÉLIO CAMPOLINA DINIZ

COMPARAÇÃO DAS PROVAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA
INDIRETA E SORONEUTRALIZAÇÃO NA TITULAÇÃO
DE ANTICORPOS ANTI-RÁBICOS EM SOROS DE
BOVINOS

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Reis


Tese apresentada ao DEPARTAMENTO DE
MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA da
Escola de Veterinária da Universi-
dade Federal de Minas Gerais, como
exigência regulamentar para a obten-
ção do grau de:

MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA

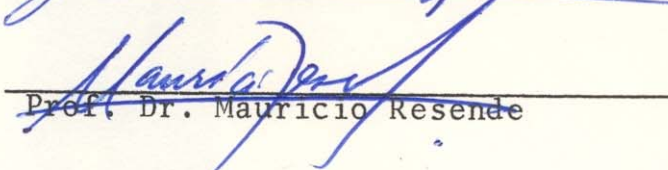
Belo Horizonte
Minas Gerais - Brasil
1973

TESE APROVADA EM: 29/10/73

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Ronaldo Reis


Prof. Dr. Jose Brito de Figueiredo


Prof. Dr. Mauricio Resende

O autor agradece

ao Professor Dr. Ronaldo Reis, pela segura e competente orientação; ao Conselho de Pesquisa da UFMG pelo auxílio concedido; a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram no presente trabalho de tese.

BIOGRAFIA DO AUTOR

v

CAMILLO CÉLIO CAMPOLINA DINIZ, filho de Adhemar Campolina de Sá e Maria do Carmo Diniz Campolina, nasceu em Esmeraldas, Minas Gerais, aos 14 dias do mês de fevereiro de 1933.

Em 1960 graduou-se em medicina veterinária pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Em 1961 exerceu a função de supervisor de defesa sanitária animal pela Secretaria da Agricultura do Estado do Espírito Santo. De 1962 a 1966 como chefe do Posto de Vigilância Sanitária Animal de Itanhandu, Minas Gerais, tendo, em 1967, assumido o cargo de encarregado do laboratório de diagnóstico, pesquisa e controle das vacinas anti-rábicas em Belo Horizonte. Possui o curso de Médico Veterinário Sanitarista pela Escola de Saúde Pública de Minas Gerais obtido em 1967, além de cursos de aperfeiçoamento em raiva, imunofluorescência em raiva, aftosa e adestramento para campanhas sanitárias. Em curso de Pós-graduação, Mestrado na área de Medicina Veterinária Preventiva junto à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, a partir de 03.03.73.

CONTEÚDO

	Página
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	5
MATERIAL E MÉTODOS	9
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÕES	30
RESUMO	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

LISTA DAS TABELAS

	Página
TABELA I - Esquemas de vacinação dos bovinos contra a raiva, realizados nos períodos de 13.12.72 a 09.03.73	12
TABELA II - Título de anticorpos anti-rábicos dos <u>so</u> ros de bovinos aos 30 dias após a vacina <u>ç</u> ão e 21 dias depois da aplicação da dose de reforço, medidos por soroneutralização, imunofluorescência indireta e im <u>u</u> no fluorescência indireta modificada	22
TABELA III - Título de anticorpos anti-rábicos dos <u>so</u> ros dos bovinos pela imunofluorescência indireta, 21 dias após a aplicação da do <u>se</u> de reforço, frente ao vírus de rua, CVS e Flury-HEP	23
TABELA IV - Comparação dos resultados das provas de soroneutralização e imunofluorescência <u>in</u> direta, dos soros de bovinos vacinados contra raiva	24

INTRODUÇÃO

A titulação de anticorpos anti-rábicos em soros de pessoas ou animais vacinados, ou mesmo em casos de raiva natural, pode ser feita, entre outros, pelo teste de soroneutralização e pelo método indireto de imunofluorescência. Os valores dos títulos de anticorpos obtidos, são peculiares a cada um, sendo os da soroneutralização expressos pelo logaritmo do vírus neutralizado e os do método de imunofluorescência indireta, pela visualização dos anticorpos nas várias diluições do soro.

As pesquisas no campo da imunologia rábica, visando ao aprimoramento de técnicas adequadas ao equacionamento dos problemas à ela relacionados, vêm merecendo a atenção de vários pesquisadores. Os autores procuram novas alternativas, no sentido de uma maior simplicidade de um método capaz de detectar anticorpos anti-rábicos, associado ao aspecto econômico e acuidade nos resultados.

A imunização de um organismo contra a raiva, geralmente, é acompanhada pelo aparecimento, no soro, de propriedades neutralizantes contra o vírus rábico. O teste de soro-neutralização é considerado padrão na determinação de anticorpos anti-rábicos, não obstante ser demorado e dispendioso, tornando-o, desta forma, desvantajoso como prova de rotina. Assim, vários autores têm aplicado e comparado com a prova de soroneutralização, outros métodos de determinação quantitativa de anticorpos anti-rábicos.

KUBES & GALLIA (1943) efetuaram um estudo sobre a reação de cérebro-neutralização e sua relação com a prova de soroneutra

lização e soroproteção. Concluíram que a reação de cérebro-neutralização demonstrou ser fiel indicador da imunidade anti-rábica, revelando grande sensibilidade e os resultados obtidos foram sempre concordantes com a prova de soroproteção. Por outro lado, o teste da soroneutralização não demonstrou as mesmas características.

BERNKOPH & NACHTIGAL (1943) fizeram um estudo comparativo entre a reação de fixação de complemento e o teste de soroneutralização. Usando soro de cobaias imunizados contra a raiva, os autores puderam detectar anticorpos anti-rábitos nos soros destes animais, não encontrando uma relação entre os títulos obtidos pela reação de fixação de complemento com os encontrados pelo teste de soroneutralização.

LIPTON & FREUND (1950), usando soros de coelhos e de cobaias imunizados contra a raiva, compararam os títulos detectados pelo teste da soroneutralização com os obtidos pela reação de fixação de complemento, concluindo pela existência de uma relação numérica entre os títulos de anticorpos neutralizantes e fixadores de complemento.

PEREIRA & cols. (1970), trabalhando com 286 amostras de soro humano, compararam a reação de fixação de complemento com a soroneutralização. Neste trabalho, os autores apresentam a seguinte correlação: soros que apresentaram resultados positivos pela reação de fixação de complemento com títulos acima de 1:4, correspondiam a títulos de anticorpos acima de 1:125 à soroneutralização. Por ser uma técnica simples, prática, pouco dispendiosa e de boa reprodutibilidade, recomendam seu emprego para a avaliação rotineira do estado imunitário das pessoas nos serviços de vacinação antirábica.

GOUGH & DIERKS (1971) compararam o teste da soroneutralização com a prova da hemo-aglutinação passiva, utilizando 347 amostras de soro humano. Apesar de oito soros apresentarem resultados discordantes, acreditaram que o grau de correlação indicou suficiente concordância entre os métodos empregados, podendo a he

mo-aglutinação passiva ser usada como método para medir títulos de anticorpos nos soros.

O que se objetiva no presente trabalho abrange os seguintes aspectos:

- a - o estabelecimento de uma correlação entre os títulos de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos vacinados obtidos pelo método de imunofluorescência indireta e soroneutralização;
- b - sensibilidade do método de imunofluorescência indireta na detecção de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos vacinados comparada à soroneutralização;
- c - determinação quantitativa de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos vacinados, mediante aplicação do método de imunofluorescência indireta modificado.

Apesar da grande importância do assunto, poucas são as pesquisas comparativas sobre estes dois métodos, visando à titulação dos soros anti-rábicos humanos e de bovinos especialmente.

As conclusões dos trabalhos existentes não são uniformes sugerindo, inclusive, novas pesquisas, a fim de que mais estudos comparativos sejam feitos, para que se possa padronizar o método de imunofluorescência indireta na avaliação dos títulos de anticorpos dos soros anti-rábicos.

REVISÃO DA LITERATURA

Especificamente no campo da virologia rábica foram, ao que parece, GOLDWASSER & KISSLING (1958) os pioneiros na detecção do antígeno e do anticorpo rábico, empregando a técnica direta e indireta de imunofluorescência. Para a pesquisa dos anticorpos anti-rábicos pelo método de imunofluorescência indireta, usaram soros anti-rábicos de pessoas que foram imunizadas experimentalmente com vacina de embrião de pato. Pelos resultados obtidos, os autores concluíram que o método de imunofluorescência indireta poderia ser uma técnica conveniente para se avaliar o estado de desenvolvimento da imunidade em homens e animais em curso de vacinação contra a raiva.

THOMAS & cols. (1963) foram os primeiros pesquisadores a fazerem um estudo comparativo entre a soroneutralização e o método de imunofluorescência indireta. Trabalharam com 588 amostras de soro humano, sendo que 166 soros foram de pessoas que nunca tinham recebido vacina. Usando tão somente uma diluição de 1:5, resultou que, dos 303 soros positivos por imunofluorescência, 285 foram pela soroneutralização. Evidenciaram uma boa aceitabilidade do método de imunofluorescência indireta, como técnica seletiva para a detecção de anticorpos anti-rábicos.

LARSH (1965), em uma comparação do método de imunofluorescência indireta com a soroneutralização, usando 76 soros obtidos de pessoas imunizadas contra raiva com vacina de embrião de pato, revelou uma grande sensibilidade do método de imunofluorescência indireta, inclusive não apresentando nenhum resultado falso positivo. Além do mais, o método de imunofluorescência indireta

ta apresentou certas vantagens sobre o teste de soroneutralização, tais como: maior simplicidade e sensibilidade, resultado rápido (um dia ao invés de 14 na soroneutralização). Apesar disto, o autor afirma ser ainda incerto a substituição da soroneutralização pelo método de imunofluorescência indireta e, inclusive, recomenda maiores estudos neste sentido.

LEFFINGWELL & IRONS (1965) procederam à titulação de anticorpos anti-rábicos pelo método de imunofluorescência indireta em 84 soros de pessoas primovacinas, e revacinadas, cujos resultados foram comparados aos obtidos pela soroneutralização. Houve uma concordância entre os dois testes em 78 (93%) soros examinados, sendo que cinco amostras resultaram positivas pelo método de imunofluorescência indireta e negativas à soroneutralização. Somente uma amostra resultou negativa ao método de imunofluorescência e positiva à soroneutralização. Em vista deste resultado, os autores acreditam que o método de imunofluorescência indireta seja mais sensível e que poderia superar à soroneutralização em sensibilidade, rapidez e alta resolução para titulações comparadas de soros de pré e pós-vacinação.

GISPEN & SAATOHF (1965) titularam anticorpos antirábicos em 61 amostras de soro humano, usando ambos os métodos. Todos os 26 soros negativos pelo método de imunofluorescência indireta também o foram à soroneutralização. Por outro lado, dos 35 soros positivos pelo método indireto de imunofluorescência, somente 33 o foram à soroneutralização. Concluíram que o método de imunofluorescência indireta é mais sensível e mais rápido do que o da soroneutralização e com alto grau de especificidade.

SELINOV & cols. (1965), utilizando 50 amostras de soro, provenientes de 40 pessoas, encontraram uma correlação entre os resultados positivos e negativos pelos métodos de imunofluorescência indireta, soroneutralização e fixação de complemento. Porém, sob o aspecto econômico e de rapidez, o método de imunofluorescência indireta foi superior aos outros dois.

PECK (1966) comparou o método de imunofluorescência indireta com a soroneutralização. Utilizou 176 amostras de soro humano, das quais 81 foram negativas e 85 foram positivas a ambos os métodos. Dez amostras positivas pelo método de imunofluorescência indireta resultaram negativas à soroneutralização. Conclui dizendo que: "o método de imunofluorescência indireta é uma prova específica para a determinação de anticorpos anti-rábitos, de maior sensibilidade que a soroneutralização e que requer de duas a três horas para sua realização, além de ser um processo econômico".

Mais recentemente, ISHIZUKA (1972) verificou que, das 125 amostras de soro bovino examinadas, 110 (88%) apresentaram resultados concordantes e as 15 (12%) restantes foram positivas à imunofluorescência indireta e negativas à soroneutralização. Os dois testes aplicados aos mesmos soros mostraram estreita associação, permitindo a rejeição da hipótese de independência das duas variáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Animais

Foram selecionadas 20 vacas da raça "Jersey", em bom estado de carne, adultas, em lactação, criadas em regime de semi-estabulação, com controle genético e com idade entre três e seis anos. Estes animais pertenciam à Fazenda Experimental de Criação do Ministério da Agricultura, Pedro Leopoldo, Minas Gerais. Nunca tinham sido vacinadas contra a raiva e se encontravam identificados por tatuagem na orelha, com os seguintes números: 3827, 3837, 3904, 3854, 3942, 3931, 3937, 3849, 3834, 3901, 4120, 4137, 4088, 4134, 3959, 4104, 4197, 3954, 4190, 4168.

2 - Vacinas

2.1. - Vacina de vírus fixo inativado pela betapropriolactona, preparada em cérebro de coelhos neonatos, concentrada a 5%, partida número 04/72, fabricada em 25 de maio de 1972 e válida até 25 de maio de 1973. Ao teste de potência de Habel apresentou uma proteção contra $10^{5,52}$ DL50, ou seja, 331.100DL50.

2.2. - Vacina Formidogel, partida número 86/72, fabricada em novembro de 1972 e válida até julho de 1973. Ao teste de potência em cobaias apresentou uma proteção de 80%.

2.3. - Vacina Flury-HEP, partida número 044/72, fabricada em dezembro de 1972 e válida até dezembro de 1973. Ao teste de potência em cobaias (Teste de Koprowski), apresentou uma proteção de 80%.

3 - Imunização

Na primo-vacinação empregamos vacina de vírus fixo inativado pela betapropriolactona, na dose de 5 ml por via sub-cutânea. Com base na idade e no esquema de vacinação, as 20 vacas foram divididas em quatro grupos:

Grupo I:

Uma única dose. Animais de números: 3827, 3837, 3904, 3854, 3942.

Grupo II:

Três doses intervaladas de 24 horas. Animais de números: 3931, 3937, 3849, 3834, 3901.

Grupo III:

Duas doses intervaladas de 15 dias. Animais de números: 4120, 4137, 4088, 4134, 3959.

Grupo IV:

Duas doses intervaladas de 30 dias. Animais de números: 4104, 4197, 3954, 4168, 4190.

Na aplicação da dose de reforço, empregamos dois tipos de vacina: Formidogel e Flury-HEP. Cada grupo foi dividido em três sub-grupos caracterizados na Tabela I. Todos os animais pertencentes ao sub-grupo um de cada grupo receberam vacina Formidogel como dose de reforço. Todos os animais pertencentes ao sub-grupo - dois de cada grupo - receberam vacina Flury-HEP como dose de reforço. Finalmente, os animais do sub-grupo três de cada grupo, não receberam dose de reforço, ficando como testemunhas de cada grupo correspondente. O intervalo entre a última dose da primo-vacinação e a aplicação da dose de reforço foi de 85, 82, 70 e 55 dias, respectivamente, para os grupos I, II, III e IV.

O esquema geral de imunização é apresentado na Tabela I.

TABELA I - Esquemas de vacinação dos bovinos contra a raiva, realizados nos períodos de 13.12.72 a 09.03.73.

Grupo.	Sub-grupo.	Animal	Primo-Vacinação				Doses de Reforço		
			Nº doses	Vacina	D a t a s		Intervalo com a Primo-vacinação (dias)	Vacina	Data Sangria
					Vacinação	Sangria			
I	1	3827 3837	1	CCoN	13.12.72	13.01.73	85	Formi-dogel.	30.03.73
	2	3904 3854						Flury-HEP.	
	3	3942						-	
II	1	3931 3937	3	CCoN	13.12.72	15.01.73	82	Formi-dogel.	30.03.73
	2	3849 3834			14.12.72 15.12.72			Flury-HEP.	
	3	3901			-				
III	1	4120 4137	2	CCoN	13.12.72	28.01.73	70	Formi-dogel.	30.03.73
	2	4088 4134			28.12.72			Flury-HEP.	
	3	3959			-				
IV	1	4104 4197	2	CCoN	13.12.72	13.02.73	55	Formi-dogel.	30.03.73
	2	3954 4190			13.01.72			Flury-HEP.	
	3	4168			-				

4 - Soros

Um total de 60 amostras de soro foram examinadas. As sangrias foram feitas assepticamente, sendo a primeira imediatamente antes da vacinação, a segunda 30 dias após a vacinação e a terceira, 21 dias depois da aplicação da dose de reforço. Os soros obtidos foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 400 g (1.500 rpm), durante 30 minutos. Todos os soros foram inativados em banho-maria a 56^oC por 30 minutos e em seguida, armazenados em congelador a -50^oC.

5 - Provas sorológicas

5.1. - Soroneutralização (SN)

Todos os soros foram submetidos à prova de soroneutralização, segundo a técnica descrita por ATANASIU (1967a). A amostra de CVS-27 (Challenge virus standard) utilizada como desafio, foi recebida do Centro Panamericano de Zoonoses, Buenos Aires, Argentina. Esta amostra foi inoculada, por via intracerebral, na dose de 0,03 ml, em 100 camundongos de 21 dias, "Swiss", linhagem "Randon-CF-CPA". Os cérebros foram colhidos, assepticamente, na fase final da doença, tendo sido preparada uma suspensão a 20% de material nervoso em água destilada estéril, com 2% do soro inativado de equino. A suspensão foi distribuída em pequenas porções em frascos tipo penicilina e mantidos a -50^oC. Dois frascos retirados, ao acaso, se prestaram para a prova de esterilidade e para a prova de titulação em camundongos.

O teste de triagem dos soros por soroneutralização, foi conduzido a uma diluição de 1:5, usando-se, como diluente, água destilada com 2% de soro normal de equino. Todos os soros positivos ao teste de triagem foram testados em diluições quíntuplas, a partir de 1:5 até 1:3.125. Os soros nas várias diluições, foram confrontados com um número variável de 10 a 70 DL50 de vírus CVS, deixados por 90 minutos a 37^oC e inoculados em camundongos. A dose de soro-vírus inoculada foi de 0,03 ml, por via intracere

5.2.2. - Preparação do conjugado anti-gama-globulina bovina.

A preparação do conjugado anti-gama-globulina bovina foi feita de acordo com a técnica descrita por CORSTVET & SADLER (1964) e constou do seguinte:

5.2.2.1. - Preparação da coluna de DEAE-Celulose

a - Dez gramas de DEAE-Celulose (1) foram levadas três vezes em solução de 0,5 M de hidróxido de sódio, a fim de eliminar a cor amarela e regenerar o intercambiador iônico. Cada lavagem foi feita sob agitação magnética por 15 minutos, sendo em seguida a massa suspensa em água destilada até alcançar pH 7,0.

b - Em seguida lavou-se várias vezes em tampão fosfato monobásico 0,5 M, para ajustar o pH a 6,3.

c - Finalmente, lavou-se várias vezes em tampão fosfato a 0,0175 M, pH 6,3.

d - Preparou-se, então, uma coluna de DEAE-Celulose de um centímetro de diâmetro, por 10 cm de altura. Na altura da coluna, observou-se a proporção de três e meio centímetros de altura para cada mililitro de soro.

e - Passou-se, através desta coluna, 50 ml de tampão fosfato a 0,0175 M, pH 6,3, sendo em seguida fechada e guardada em geladeira a 4°C.

5.2.2.2. - Conjugação da anti-gama-globulina bovina

Em um erlenmeyer de 50 ml, colocamos três mililitros de anti-gama-globulina bovina, cuja concentração em proteína total foi determinada pelo refratômetro (2), deixando-os sob agitação

(1) Cellex-D, Bio Rad Laboratoires, 32nd, Griffin, Rechmond, California, USA.

(2) Atago Serum Refractometer. Atago Optical Works Co. Ltda. Japan.

magnética em geladeira a 4°C por 15 minutos. Nestas condições, adicionou-se, gota a gota, 0,3 ml (10% do volume do soro) de tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0, permanecendo, ainda, sob agitação magnética a 4°C. A conjugação foi feita sob agitação magnética a 4°C, após adição lenta de 1 mg de isotiocianato de fluoresceína (1) para cada 40 mg de proteína total de anti-gama-globulina bovina, durante 14 horas. Após este período, a coluna de DEAE-Celulose, anteriormente preparada, foi retirada da geladeira, aberta, e, quando o menisco inferior do tampão fosfato estava justamente na superfície superior da massa da coluna de DEAE-Celulose, adicionou-se, lentamente à coluna, 3 ml do conjugado. Quando todo o conjugado se infiltrou na massa de DEAE-Celulose, adicionou-se, com cuidado, tampão fosfato de sódio a 0,0175 M, pH 6,3, até completar a coluna. O conjugado foi colhido em tubos de tampa de rosca em banho de gelo, cessando-se a colheita tão logo do aparecimento de líquido sem cor esverdeada. As frações foram agrupadas pela intensidade de coloração e dializadas contra salina a 0,85%, sob agitação magnética a 4°C, até se conseguir ausência de fluorescência na água de diálise. O conjugado assim obtido, foi, após sua titulação, dividido em pequenas porções e mantido em congelador a -50°C. Na titulação do conjugado, empregamos soro-imune conhecido de bovino. As lâminas foram observadas em um microscópio de fluorescência (2), binocular, standard WL, objetiva de imersão 40X provida de diafragma, ocular 10X, condensador de campo escuro, iluminação com lâmpada de mercúrio- HBO - 200 - filtro excitador UG-2 e filtro barreira O/41.

5.2.3. - Preparação das lâminas

Duas impressões por lâmina foram preparadas a partir de cérebro de camundongos infectados com vírus de rua, CVS e Flury-

(1) Baltimore Biological Laboratories, Division of Bioquest, Vocksville, Maryland 21030, USA.

(2) Carl Zeiss - Companhia Ótica e Mecânica. Oberkochen - WG.

HEP. Como controle da especificidade da fluorescência preparou-se lâminas a partir de cérebro de camundongos normais. Empregamos seis impressões para cada diluição do soro. Após secagem das impressões em temperatura ambiente por 30 minutos, as lâminas foram fixadas em acetona a -15°C por 30 minutos, sendo em seguida mantidas em congelador a -50°C , durante um período inferior a sete dias, até o momento de seu uso. A riqueza de aglomerados de antígeno rábico nas lâminas foi determinada pela prova direta de imunofluorescência, segundo a técnica descrita por ATANASIU (1965).

5.2.4. - Coloração das lâminas

Todos os soros submetidos à prova de soroneutralização, foram também titulados pelo método indireto de imunofluorescência. As amostras de soro foram inativadas em banho-maria a 56°C , por 30 minutos. A diluição de triagem usada foi de 1:5. Os soros positivos à diluição de 1:5 foram, então, testados nas seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:50 e 1:100, usando-se, como diluente, salina 0,85%. As diluições dos soros, assim preparadas, foram testadas frente a três antígenos rábicos, isto é, vírus de rua, CVS e Flury-HEP. Soros positivos e negativos foram usados como controle, bem como lâminas controle contendo impressões de cérebro de camundongos normais. As impressões das lâminas, após delimitadas com esmalte de unha, não cintilante, foram tratadas com as diluições do soro, colocadas em câmara úmida e levadas para a estufa a 37°C por 60 minutos. Em seguida foram lavadas rapidamente em salina tamponada pH 7,2 e enxaguadas em água destilada. Após secagem em temperatura ambiente, as impressões foram cobertas com o conjugado anti-gama-globulina bovina, diluído a 1:10 em uma suspensão a 20% de cérebro de camundongo normal, voltando à estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas da maneira anteriormente descrita, secas em temperatura ambiente e montadas em glicerina tamponada pH 7,2 (nove parte de glicerina para uma parte de salina tamponada). Finalmente, foram examinadas ao microscópio de fluorescência. Considerou-se, como negativos, os soros

que, na diluição de 1:5, não determinaram o aparecimento de corpúsculos fluorescentes.

Como a nossa hipótese inicial de trabalho é de que, os dois métodos não apresentariam resultados diferentes, fixou-se, para rejeição da hipótese de nulidade, o risco de erro menor que 5%.

5.3. - Imunofluorescência indireta modificada (IFIM)

A realização desta prova foi feita simultaneamente com a da soroneutralização, baseando-se no método de imunofluorescência indireta, descrito anteriormente. A modificação feita em relação ao método clássico, constituiu-se em empregarmos as mesmas diluições do soro-virus, preparadas para a prova de soroneutralização. Assim, os soros, em suas várias diluições, foram misturados com um número variável de 10 a 70 DL50 de virus CVS, incubados durante 90 minutos a 37°C e utilizados para a imunofluorescência indireta modificada e para a soroneutralização.

Consideramos, como negativos, os soros que na diluição 1:5, não determinaram o aparecimento de corpúsculos fluorescentes.

RESULTADOS

1 - Soroneutralização (SN)

Todas as amostras de soro obtidas antes da vacinação foram negativas ao teste de soroneutralização.

Na tabela II, apresentamos os resultados dos testes de soroneutralização dos soros, obtidos aos 30 dias após a vacinação e 21 dias depois da aplicação da dose de reforço. Exceto um dos soros dos obtidos aos 30 dias após a vacinação e que apresentou título de 1:5, todas as outras amostras foram negativas à soroneutralização. Aos 21 dias após receberem a dose de reforço, 11 animais em 16 revacinados, apresentaram títulos neutralizantes, enquanto os não revacinados, isto é, que ficaram como testemunhas de cada grupo, continuaram negativos ao teste de soroneutralização. Os títulos dos soros neste teste variaram desde 1:5 até 1:756 entre os animais dos sub-grupos.

2 - Imunofluorescência indireta (IFI)

Todas as amostras de soro, obtidas antes da vacinação, foram negativas à imunofluorescência indireta.

Na tabela II, apresentamos, também, os resultados da imunofluorescência indireta dos soros examinados. Somente uma amostra de soro, das obtidas aos 30 dias após a vacinação, resultou positiva a esta prova, apresentando título igual a 1:5. As outras 19 restantes foram negativas, com título inferior a 1:5.

Dos soros obtidos das 16 vacas, aos 21 dias depois da aplicação da dose de reforço, dois foram negativos à diluição de

1:5, enquanto os outros 14, resultaram positivos à imunofluorescência indireta, nas diluições que variaram de 1:5 até 1:50. Os soros das quatro vacas que ficaram como testemunhas, sendo uma em cada grupo, e, que não receberam dose de reforço de vacina, foram negativos por este método.

Na tabela III, é mostrado o resultado da titulação dos soros pela imunofluorescência indireta, frente a três antígenos rábicos: vírus de rua, CVS e Flury-HEP. Dos soros obtidos de 16 vacas, 21 dias após terem recebido uma dose de vacina como reforço, 14 apresentaram título frente ao vírus de rua e 12 resultaram positivos frente ao CVS e Flury-HEP. Dois soros foram negativos frente aos vírus de rua e quatro foram negativos frente ao CVS e Flury-HEP. Os soros das vacas tidas como testemunhas reagiram negativamente frente aos três antígenos rábicos. Os títulos dos soros, frente ao vírus de rua, variaram de 1:5 até 1:50, enquanto, os obtidos frente aos CVS e Flury-HEP, variaram de 1:5 até 1:25.

Na tabela IV, apresentamos uma comparação dos resultados obtidos pela imunofluorescência indireta e soroneutralização. Das 60 amostras de soro examinadas pela imunofluorescência indireta, 14 resultaram positivas e 46 negativas. À soroneutralização, 11 soros resultaram positivos e 49 negativos. Houve uma concordância de resultados entre os dois métodos em 57 (95%) das amostras de soro. Três soros, dos 14 positivos pela imunofluorescência indireta, resultaram negativos à soroneutralização. A concordância entre os soros positivos foi de 78,6% e, entre os negativos, foi de 93,9%. A frequência de soros positivos à imunofluorescência indireta foi de 23,3% e, à soroneutralização, foi de 18,3%. A diferença da frequência de resultados entre os soros positivos foi de 5%. Nesta tabela encontra-se, também, o valor calculado para o χ^2 (0,44).

TABELA II - Título de anticorpos anti-rábicos dos soros de bovinos aos 30 dias após a vacinação e 21 dias depois da aplicação da dose de reforço, medidos por SN, IFI e IFIM.

Gru po.	Sub gru po.	Animal	Título de anticorpos anti-rábicos					
			SN**		IFI ⁺		IFIM ⁺⁺	
			30 dias após a vacina- ção	21 dias após a dose de reforço	30 dias após a vacina- ção	21 dias após a dose de reforço	30 dias após a va- cinação	21 dias após a do- se de re- forço
I	1	3827	Neg.	1:500	Neg.	1:50	Neg.	1:5
		3837	Neg.	1:45	Neg.	1:5	Neg.	Neg.
	2	3904	Neg.	Neg.	Neg.	1:5	Neg.	Neg.
		3854	Neg.	1:5	Neg.	1:5	Neg.	Neg.
	3	3942*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
	II	1	3931	Neg.	1:275	Neg.	1:25	Neg.
3937			Neg.	1:260	Neg.	1:25	Neg.	Neg.
2		3849	Neg.	Neg.	Neg.	1:25	Neg.	Neg.
		3834	Neg.	1:15	Neg.	1:5	Neg.	Neg.
3		3901*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
III		1	4120	Neg.	1:170	Neg.	1:25	Neg.
	4137		Neg.	1:625	Neg.	1:50	Neg.	1:5
	2	4088	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
		4134	Neg.	Neg.	Neg.	1:5	Neg.	Neg.
	3	3959*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
	IV	1	4104	Neg.	1:756	Neg.	1:50	Neg.
4197			Neg.	1:260	Neg.	1:25	Neg.	Neg.
2		3954	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
		4190	1:5	1:15	1:5	1:25	Neg.	Neg.
3		4168*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

* - Não recebeu dose de reforço; ** - Soroneutralização
 + - Imunofluorescência indireta; ++ - Imunofluorescência indireta modificada.

TABELA III - Título de anticorpos anti-rábicos dos soros de bovinos pela imunofluorescência indireta, 21 dias após a aplicação da dose de reforço, frente ao vírus de rua, CVS e Flury-HEP.

Grupo	Sub-grupo	Animal	Vacina	Tipo de vírus		
				Rua	CVS	Flury-HEP
I	1	3827	Formidogel	1:50	1:5	1:5
		3837	Formidogel	1:5	1:5	1:5
	2	3904	Flury-HEP	1:5	1:5	1:5
		3854	Flury-HEP	1:5	1:5	1:5
	3	3942*	-	Neg.	Neg.	Neg.
	II	1	3931	Formidogel	1:25	1:5
3937			Formidogel	1:25	1:5	1:5
2		3849	Flury-HEP	1:25	1:25	1:5
		3834	Flury-HEP	1:5	Neg.	Neg.
3		3901*	-	Neg.	Neg.	Neg.
III		1	4120	Formidogel	1:25	1:5
	4137		Formidogel	1:50	1:5	1:5
	2	4088	Flury-HEP	Neg.	Neg.	Neg.
		4134	Flury-HEP	1:5	Neg.	Neg.
	3	3959*	-	Neg.	Neg.	Neg.
	IV	1	4104	Formidogel	1:50	1:25
4197			Formidogel	1:25	1:5	1:5
2		3954	Flury-HEP	Neg.	Neg.	Neg.
		4190	Flury-HEP	1:25	1:25	1:25
3		4168*	-	Neg.	Neg.	Neg.

* - Não recebeu dose de reforço.

TABELA IV - Comparação dos resultados das provas de soroneutralização e imunofluorescência indireta, dos soros de bovinos vacinados contra raiva.

IFI \ SN	Positivos	Negativos	TOTAL
Positivos	11	0	11
Negativos	3	46	49
TOTAL	14	46	60

$$X^2 = 0,44$$

DISCUSSÃO

Após a demonstração de anticorpos anti-rábicos pelo método de imunofluorescência indireta, introduzido por GOLDWASSER & KISSLING (1958), vários estudos foram feitos no sentido de compará-lo à soroneutralização.

Nesta pesquisa, procuramos relacionar os títulos de anticorpos anti-rábicos obtidos pela imunofluorescência indireta e soroneutralização. Encontramos uma discordância de resultados em três (5%) soros dos 60 examinados. Estes três soros reagiram positivamente à imunofluorescência indireta (baixos títulos de anticorpos) e negativamente à soroneutralização, o que evidencia uma maior sensibilidade da imunofluorescência indireta sobre a soroneutralização em termos de demonstração de anticorpos. Esta maior sensibilidade está diretamente ligada ao fato de que, pela imunofluorescência não podemos quantificar os anticorpos, mas sim, detectá-los, até mesmo em soros com baixos índices de anticorpos.

THOMAS & cols. (1963) encontraram uma discordância de resultados em 78 (13,2%) amostras de soro, das 588 examinadas. Isto porque estes 78 soros possuíam baixos níveis de anticorpos, não sendo possível detectá-los pela prova de soroneutralização, mesmo quando se usou uma diluição a 1:2 e desafiados com um número variável de 10 a 100 DL50 de vírus.

LARSH (1965) encontrou, também, discordância de resultados nas 76 amostras de soro examinadas. Assim, dos 38 soros obtidos dos pacientes antes da aplicação da dose de reforço, 29 (76%) resultaram positivos à imunofluorescência indireta e 27 (71%) à

soroneutralização. Das 38 amostras colhidas após a aplicação da dose de reforço nestes mesmos pacientes, 37 (97,4%) foram positivos à imunofluorescência. Destas, 37 foram testadas pela soroneutralização, resultando 31 (84%) positivas. Houve uma discordância de resultado em dois (5,2%) soros entre os obtidos antes da aplicação da dose de reforço e, em seis (15,8%) soros, entre os obtidos após a inoculação da dose de reforço. Um fator importante na interpretação destes resultados, foi que as sangrias, após a dose de reforço, foram feitas aos sete dias ao invés de 30 dias depois. Provavelmente, a qualidade e a quantidade de anticorpos determinaram estas diferenças.

LEFFINGWELL & IRONS (1965) trabalhando com 84 amostras de soro humano encontraram resultados discordantes em 5,7% destas amostras. Assim, 34 soros foram positivos à imunofluorescência in direta e, somente 29 o foram à soroneutralização. Destes cinco soros, três foram obtidos antes dos 30 dias da última vacinação. Para eles, haveria uma relação direta entre o log. do vírus neutralizado com o título obtido pela imunofluorescência. Soros com título de anticorpos neutralizantes menor que log. de 1,7 foram considerados negativos.

GISPEN & SAATHOF (1965) encontraram uma discordância de resultado em duas (3,28%) amostras de soro, das 61 examinadas. Como ambas foram obtidas entre 13 e 17 dias após a vacinação, concluíram que suas reações poderiam ser específicas.

Para SELINOV & cols. (1965), a discordância de resultados em quatro (8%) soros dos 50 examinados, é explicada pela insuficiência de standardização das reações, inclusive, variabilidade das doses de vírus empregadas na soroneutralização, e aparecimento precoce de anticorpos de duração efêmera.

Por sua vez, PECK (1966) encontrou uma discrepância de resultados em 10 (5,6%) soros, dos 176 examinados. Estes resultados foram atribuídos ao fato de que estes 10 soros possuíam baixos níveis de anticorpos neutralizantes.

Para ISHIZUKA (1972), o método de imunofluorescência indireta permite detectar níveis de anticorpos imperceptíveis à soroneutralização.

Todos estes pesquisadores foram unânimes em afirmar que, além de uma maior sensibilidade, a imunofluorescência indireta supera a soroneutralização em economia e rapidez nos resultados.

Os nossos resultados mostram que o método indireto de imunofluorescência apresentou uma concordância com a prova da soroneutralização em 95% dos resultados. O valor de X^2 (qui-quadrado) calculado com a correção por continuidade de Yates, citado por BANGROFT (1967), foi de 0,44, segundo os dados da Tabela IV. Este valor revelou que, a diferença observada entre os dois métodos não foi estatisticamente significativa.

Com relação aos valores dos títulos de anticorpos obtidos por um e outro método, observamos, pela Tabela II, que eles guardam entre si, uma certa proporção. Assim, soros com títulos de 1:5, determinados pela imunofluorescência indireta, corresponderam a títulos iguais ou menores que 1:5 à soroneutralização. Soros com títulos de 1:25, foram iguais ou menores que 1:275 à soroneutralização. Finalmente, soros com títulos de 1:50, corresponderam a títulos iguais ou menores que 1:756 à soroneutralização.

Em dois soros (3849 e 4190), esta proporção não foi observada. Provavelmente, tenha havido uma interferência de outros tipos de anticorpos, que não os neutralizantes e que foram detectados pela imunofluorescência, o que não ocorre com a soroneutralização. Segundo CAMPBELL & cols. (1967), deveria estabelecer, em bases quantitativas, a correlação entre as diferentes variedades de anticorpos (neutralizantes, fixadores de complemento, precipitantes, inibidores da hemoaglutinação e citolíticos) e a imunidade. Há evidência de uma acentuada diferença no efeito protetor das gama-globulinas específicas, 19S (precoces) e 7S (tardias), na dinâmica da formação destes anticorpos depois da vacinação.

Segundo os dados da Tabela III, obtivemos melhores resultados, quando empregamos o vírus de rua, na titulação dos anticorpos dos soros. Segundo GOLDWASSER & KISSLING (1958), excelentes colorações foram obtidas com este tipo de antígeno, no estudo de soro-imune, derivados de pessoas imunizadas contra raiva, inclusive, podendo ser empregado para avaliação do desenvolvimento da imunidade em homens e animais, em curso de vacinação contra a raiva.

A determinação quantitativa de anticorpos anti-rábicos dos soros, pelo método indireto de imunofluorescência modificado foi feita com base no número de DL50 de vírus neutralizado e calculada segundo os resultados da prova de soroneutralização.

Segundo ATANASIOS (1967b), citado por PEREIRA e cols. (1970) soros com níveis de anticorpos anti-rábicos de 1:25 ou mais, quando desafiados contra 20 DL50 de CVS na soroneutralização, assegura uma certa proteção. Empregamos um número variável de 10 a 70 DL50 de CVS, o que satisfaz tal exigência. Assim, conforme podemos notar na Tabela II, somente soros com títulos de 1:50, demonstrados pela imunofluorescência indireta, corresponderam a títulos de 1:5 no método de imuno-fluorescência modificado. Houve uma quantidade suficiente de anticorpo para neutralizar as DL50 de CVS utilizadas na mistura soro-vírus e ainda sobrou anticorpo que foi detectado. À soroneutralização corresponderam a títulos iguais ou menores que 1:756. Soros com títulos iguais ou inferiores a 1:25, determinados por imunofluorescência indireta, resultaram negativos no método modificado. Provavelmente, nestes casos, os anticorpos foram neutralizados pelo vírus utilizado no desafio. À soroneutralização, estes soros alcançaram títulos iguais ou menores que 1:275.

Desde que se disponha de uma amostra de CVS, devidamente titulada, acreditamos que esta técnica seria de grande valia na titulação quantitativa de anticorpos antirábicos em soros de pessoas ou animais, em curso, ou após terem sido vacinados contra a raiva. A técnica é simples, não requer mais que quatro horas pa-

ra sua realização, além de se poder trabalhar com mais de uma amostra de soro por dia.

Pelos resultados obtidos na presente pesquisa, as seguintes conclusões são evidentes:

1 - Os valores dos títulos de anticorpos anti-rábicos, obtidos pela imunofluorescência indireta, foram inferiores aos da soroneutralização e guardam entre si, uma proporção dez vezes menor, aproximadamente.

2 - O método de imunofluorescência indireta apresentou uma concordância com a prova de soroneutralização em 95% dos resultados.

3 - A análise estatística revelou que a diferença de resultado em 5% dos soros, observada entre os dois métodos, não foi estatisticamente significante.

4 - Em soros com baixo índice de anticorpos, o método de imunofluorescência indireta apresentou uma maior sensibilidade do que a soroneutralização.

5 - Melhores resultados foram obtidos com o vírus de rua na titulação dos anticorpos dos soros pela imunofluorescência indireta.

6 - O método de imunofluorescência indireta modificado pode ser aplicado, em condições de rotina, na avaliação quantitativa dos anticorpos anti-rábicos dos soros de bovinos em curso, ou após terem sido vacinados contra a raiva.

Foram testadas pela imunofluorescência indireta e soroneutralização, 60 soros de bovinos vacinados contra a raiva. Houve uma concordância de resultados em 95% dos soros. Dos 14 soros positivos à imunofluorescência indireta, 11 o foram à soroneutralização. Dos 49 soros que resultaram negativos à soroneutralização, 46 o foram à imunofluorescência indireta. A análise destes resultados mostrou não haver diferenças estatisticamente significantes entre eles. Os títulos de anticorpos anti-rábicos, obtidos pela imunofluorescência indireta, foram menores que os obtidos pela soroneutralização, embora a imunofluorescência indireta apresentasse uma maior sensibilidade sobre a soroneutralização, em soros com baixa concentração de anticorpos. Na preparação das impressões nas lâminas, conseguiu-se melhores resultados com o vírus rábico de rua, do que com o vírus fixo, na detecção dos anticorpos pela imunofluorescência. O método de imunofluorescência indireta modificado, aplicado na demonstração quantitativa dos anticorpos anti-rábicos, talvez possa ser utilizado na avaliação da imunidade em bovinos vacinados.

- ATANASIU, P., 1965. La Inmunofluorescencia in Curso Teorico Practico Sobre Laboratorio y Epidemiologia de la Rabia. Centro Panamericano de Zoonosis. Buenos Aires, Argentina. P. 38-68.
- ATANASIU, P., 1967(a). Titrage des anticorpos rabiques pratiqué sur les sérums humains. Bull. Off. Int. Epizoot., 67 (3-4) : 383-387.
- ATANASIU, P., 1967(b). Informação pessoal. In Pereira e cols. (1970).
- BANCROFT, H., 1967. Introduction a la Bioestatistica. Editorial Universitaria, 4a. edição. Buenos Aires. 246 págs.
- BENACERRAF, B., OVARY, A., BLOCH, K. L. & FRANKLIN, E.C., 1963. Properties of guinea pig antibodies. Electrophoretic separation of two types of guinea pig antibodies. J. Exp.Med., 117: 937-949.
- BERNKOPH, H. & NACHTIGAL, D., 1943. Complement fixation test with sera animals immunized with rabies virus. Proc.Soc.Exp. Biol., 53 : 36-38.
- CAMPBELL, J., KOPROWSKI, H., KUWERT, E., SOKOL, F. & WIKTOR, T., 1967. Capitulo II. Presente y Futuro em la Investigacion de la Rabia in Primer Seminario Internacional sobre Rabia para las Americas. Centro Panamericano de Zoonosis. Ramos Mejia (Buenos Aires). Argentina. P. 35-48.

- CORSTVET, R.E. & SADLER, W. W., 1964. The diagnosis of certain avian diseases with the fluorescent antibody technique. Poultry Sci., 43 : 1280-1288.
- GISPEN, R. & SAATHOF, B., 1965. Neutralizing and fluorescent antibody response in man after antirabies treatment with suckling rabbit brain vaccine. Archiv. Ges Virusforsch., 15 : 377-386.
- GOLDWASSER, R.A. & KISSLING, R.F., 1958. Fluorescent antibody staining of street and fixed virus antigens. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 98 : 219-223.
- GOUGH, P. M. & DIERCKS, R.E., 1971. Passive haemagglutination test for antibodies against rabies virus. Bull. World Hlth. Org., 45 : 741-745.
- ISHIZUKA, M. M., 1972. Adaptação da Prova de Imunofluorescência Indireta para Avaliação de Anticorpos Anti-rábicos em Soros de bovinos. Estudo Comparativo com a Prova de Soroneutralização. Tese. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. São Paulo.
- KUBES, V., 1965. El metodo de la precipitacion em gelosa y el diagnostico de la rabia. Bol. Ofic. Sanit. Panamer., 59(4) : 298-312.
- KUBES, V. & GALLIA, F., 1943. La cerebro-neutralización, nueva reacción biológica para el virus rábico. Su relación con la prueba de protección y la sero-neutralización. Bol. Inst. Invest. Vet., 1 (4) : 105-147.
- LARSH, S.E., 1965. Indirect fluorescent antibody and serum neutralization response in pre-exposure prophylaxis against rabies. Ann. Intern. Med., 63 (6) : 955-964.
- LEFFINGWELL, L. & IRONS, J. V., 1965. Rabies antibodies in human serum titrated by the indirect FA method. Publ. Hlth. Rep., 80 (11) : 999-1004.

- LIPTON, M. M. & FREUND, J., 1950. The formation of complement fixing and neutralizing antibodies after infections of inactivated rabies virus with adjuvants. J. Immunol. 64 : 297 - 303.
- PECK, F. B. (Jr), 1965. The detection of human rabies antibody by the indirect fluorescence test. Inter. Symp. Rabies, Talloires, N. Y., 1 : 201-206.
- PEREIRA, O.A.C., RAPHAELIAN, T. & COUTINHO, N., 1970. Complement fixation test in evaluation of immunity against rabies. Rev. Microbiol., 1 (2) : 85-91.
- REED, L. J. & MUENCH, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Amer. Hyg., 27 (3) : 493-497.
- SELINOV, M. A., LEBEDEUA, I. R. & KLYUEVA, E. V., 1966. Titration of rabies antiserum with the aid of the indirect fluorescent antibody method. Zhurnal Microbiol. Epidemiol. Immunobiol., 43 : 108-112.
- THOMAS, J. B., SIKES, R. K. & RICKER, A. S., 1963. Evaluation of indirect fluorescent antibody technique for detection of rabies antibody in human sera. J. Immunol., 91:721-723.