

“TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA EM AMOSTRAS DE SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE BOVINOS INFECTADOS PELO VÍRUS DA RAIVA: DADOS PRELIMINARES”

ACHKAR, S.M.^{1*}; FERNANDES, E.R.²; CASTRO, A.B.M.¹; CARRIERI, M.L.¹; DUARTE, M.I.S.²; KOTAIT, I.¹

INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa altamente letal que acomete o Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos, sendo considerada um grave problema de Saúde Pública, principalmente em países em desenvolvimento, em que os casos não são habitualmente notificados, dificultando assim o conhecimento de sua real incidência (1).

É causada por um vírus RNA de fita simples do gênero *Lyssavirus*, pertencente à família *Rhabdoviridae*, sendo considerada uma zoonose reemergente (2).

Estatísticas apontam para aproximadamente 55.000 mortes anuais decorrentes da infecção no mundo, sendo a grande maioria concentrada na Ásia e África, atingindo principalmente crianças (30 a 50%) (3). A cada 15 minutos morre uma pessoa de raiva e mais 300 são expostas ao agente (4).

Os reservatórios da doença pertencem às ordens *Carnivora* e *Chiroptera*. A fonte de infecção é o animal doente, que transmite o vírus através de lambeduras, arranhaduras e/ou mordeduras, sendo esta última, a forma mais comum de transmissão e com especial importância epidemiológica. Existem dois ciclos de transmissão da doença; o urbano, em que o cão é o principal transmissor, e o silvestre, mantido por carnívoros silvestres e quirópteros (5).

A raiva pode ser transmitida por todas as espécies de morcegos, hematófagos ou não. Os morcegos hematófagos estão presentes apenas em regiões do Caribe e América Latina, e são representados por três espécies; *Diaemus youngii*, *Diphylla ecaudata* e *Desmodus rotundus*, sendo esta última a principal transmissora da raiva para os animais de interesse econômico, além de ser crescente a transmissão em humanos por estes animais. No Brasil, já foram relatados casos de raiva em 36 espécies de morcegos de hábitos alimentares hematófagos, frugívoros, insetívoros e onívoros (6).

Dentre as espécies herbívoras, os bovídeos são os mais afetados pela infecção, o que gera significativas perdas econômicas à indústria agropecuária, pois além da morte de animais acometidos, ocorrem espoliações nos animais atacados por morcegos hematófagos. O período de incubação nestes animais é relativamente longo, variando de 25 a 150 dias. Os animais infectados se isolam do grupo, apresentando letargia, depressão, inquietude, pêlos

1.Instituto Pasteur de São Paulo, 2.Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

arrepiados e hipersensibilidade no local da ferida, seguido de midríase, tremores musculares e tenesmo. Os acessos de fúria são raros, e logo que a paralisia se instala o animal vai a óbito em poucas horas.

Os métodos empregados tradicionalmente para o diagnóstico da raiva são: a imunofluorescência direta (IFD) (7), com o emprego de um conjugado anti-rábico policlonal anti-ribonucleocapsídeo, e o isolamento viral, o qual pode ser realizado em camundongos albinos suíços (8) ou em cultivo celular, utilizando-se linhagem de células N2A (neuroblastoma de camundongo) (9).

Paralelamente, metodologias de pesquisa são empregadas como suporte do diagnóstico tradicional da raiva, como a tipificação antigênica, utilizando-se um painel de anticorpos monoclonais para caracterizar variantes antigênicas (10); a transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) (11) e o seqüenciamento do DNA, para posterior análise filogenética.

A caracterização antigênica de amostras positivas para a raiva tem demonstrado o isolamento da variante 3 (*Desmodus rotundus*) de amostras provenientes de cães, gatos, morcegos e herbívoros, no Estado de São Paulo (12). Isto enfatiza a importância do morcego *Desmodus rotundus* como reservatório do vírus da raiva e como transmissor da doença para animais domésticos (urbanos e rurais).

Dentre as medidas de vigilância epidemiológica, o envio de amostras de animais suspeitos ao laboratório é o mais recomendado, entretanto, nos países em desenvolvimento, essa vigilância não atinge todas as regiões geográficas. Além disso, em localidades em que as temperaturas ambientais são altas, ocorre uma dificuldade na preservação de amostras.

A possibilidade de preservar tais amostras, através de fixação em formol 10% e posterior inclusão em parafina, facilitaria o transporte das mesmas e a integridade do material a ser analisado, por outro lado, inviabilizaria a execução da técnica de IFD, que é o método mais utilizado para a detecção do antígeno do vírus da raiva. Sendo assim, a utilização de técnica imuno-histoquímica no diagnóstico da raiva pode ser uma alternativa para amostras fixadas em formol ou que necessitam ser enviadas aos Centros de Referência de Diagnóstico de Raiva, em geral, muito distantes das localidades em que ocorrem os casos.

A técnica de imuno-histoquímica consiste na detecção de antígenos através da utilização de anticorpos monoclonais ou policlonais em tecidos. Sua execução não requer equipamentos especializados e nem uma infra-estrutura complexa. Estas características a tornam uma técnica ideal sob condições de campo, em que existe uma limitação de laboratórios diagnósticos, contribuindo assim na vigilância epidemiológica em áreas de difícil acesso e os resultados podem definir a tomada de decisões em relação aos indivíduos agredidos.

Com base nessas considerações, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade da técnica imuno-histoquímica para o diagnóstico de raiva em

bovinos e quantificar as células infectadas pelo vírus da raiva, analisando sua distribuição nos fragmentos do SNC.

MATERIAL E MÉTODOS

No Laboratório de Diagnóstico do Instituto Pasteur de São Paulo (IP), a partir do SNC de bovinos suspeitos de raiva são processadas duas lâminas de cada fragmento, sendo: Córtex cerebral (CX), Corno de Amon (CA), Cerebelo (CB) e Bulbo (BB), as quais são submetidas à técnica de Imunofluorescência direta (IFD), segundo protocolo descrito por Dean *et al.*, 1996. A reação é revelada com conjugado anti-rábico policlonal antinucleocapsídeo, produzido com soro hiperimune de coelho, no IP. Os resultados são obtidos por leitura em microscópio de fluorescência. Paralelamente, são preparadas suspensões a 20% (peso/volume) dos fragmentos do SNC destes animais, sendo inoculadas por via intracerebral (IC) em sete camundongos albinos suíços de 21 dias, com peso entre 11 e 14g, para cada amostra, de acordo com a técnica preconizada por Koprowski, 1996. Os animais são observados diariamente e, os que adoecem são submetidos a eutanásia, sendo processadas lâminas de seu SNC, para comprovar o isolamento viral.

As amostras diagnosticadas positivas foram tipificadas antigenicamente pela técnica de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais, cujo painel foi produzido pelo CDC/Atlanta, sendo todas caracterizadas como variante 3, própria do morcego hematófago *Desmodus rotundus*.

Foram selecionadas sete amostras positivas nas técnicas descritas anteriormente, para a execução da técnica de imuno-histoquímica, objetivando a marcação do vírus da raiva.

Quadro 1: Dados demográficos dos bovinos diagnosticados com raiva.

AMOSTRA	IDADE (meses)	SEXO	VACINADO	ÓBITO	LOCALIDADE
01	12	M	N/I	Natural	Pedra Bela – SP
02	12	N/I	N/I	Natural	Joanópolis – SP
03	24	M	N/I	Eutanasiado	Lindóia – SP
04	12	M	S	Eutanasiado	Joanópolis – SP
05	12	F	N	Eutanasiado	Caconde – SP
06	18	F	N/I	Natural	Iacri – SP
07	24	F	S	Natural	São Sebastião da Grama - SP

N/I – Não informado

Fragmentos de 6mm do Córtex cerebral (CX), Corno de Amon (CA), Cerebelo (CB) e Bulbo (BB) foram fixados separadamente em solução de formol a 10% tamponado por 12 horas, sendo trocada esta solução e os cortes mantidos por mais 48 horas em formol. Posteriormente, ocorreu a desidratação destes materiais em soluções alcoólicas em concentrações graduais,

diafanização em banhos de xilol, banhos em parafina líquida e finalmente, inclusão em blocos de parafina. Os blocos foram submetidos à microtomia, sendo produzidos cortes de 4µm de espessura em lâminas previamente silanizadas, para evitar o deslocamento dos cortes.

Para detecção do vírus da raiva foi empregado o método imuno-histoquímico Estreptavidina-biotina peroxidase (13), com metodologia parcialmente modificada e padronizada no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As etapas que compõem o método estão descritas a seguir: desparafinização dos cortes; hidratação dos cortes; bloqueio de peroxidase endógena; recuperação antigênica; bloqueio das proteínas inespecíficas; incubação com anticorpo primário policlonal (Instituto Evandro Chagas); incubação com o *Kit* LSAB peroxidase (Dako cód. K0690); revelação da reação com o emprego de cromógeno; contracoloração com hematoxilina de Mayer's; desidratação; diafanização em xilol; montagem com resina.

Para a análise dos resultados foi realizada a quantificação de células imuno-marcadas, por dois observadores independentes, utilizando-se uma gráticula na ocular para orientação e definição do tamanho da área. Essa gráticula define uma área de 0,0625 mm², utilizando-se ocular de 10x e objetiva de 40x. Foram quantificados 30 campos no SNC nas quatro regiões pré-determinadas (CX, CA, CB e BB), alternando-se entre substância branca e substância cinzenta. Os valores foram recolhidos em planilha e analisados por pacote estatístico *Graph Pad Prism 4.0 para Windows* (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

Os valores obtidos foram comparados pelo teste não-paramétrico de *Kruskall-Wallis*, onde foram consideradas significantes diferenças cuja probabilidade de igualdade era menor que 0.05 (P<0.05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação imuno-histoquímica demonstrou alta sensibilidade para detecção de antígeno da raiva no tecido parafinado de amostras de bovinos. Ao analisar a distribuição da infecção nas diferentes regiões do SNC, verificou-se que, embora não houvesse diferenças estatisticamente significantes entre as regiões, o cerebelo mostrou maior número de células infectadas, seguido do córtex cerebral, bulbo e corno de Amon. Grande parte das células infectadas foram neurônios, com raras células gliais, também imuno-marcadas com o vírus.

Em relação à diferentes regiões do SNC infectadas, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as mesmas, entretanto, foi evidenciada, através da análise das medianas, uma maior positividade de células infectadas no cerebelo. Vários estudos experimentais e em humanos discutem quais seriam os fragmentos mais indicados para a detecção do antígeno viral, contudo, esses fragmentos podem variar, de acordo

com a virulência e patogenicidade da cepa. Verificou-se que, freqüentemente, as células de Purkinje são infectadas pelo vírus, sendo, portanto, o cerebelo uma região muito indicada para o diagnóstico da raiva, tanto em amostras animais quanto em humanas.

A ausência de medidas corretas no acondicionamento de amostras e a falta de metodologias de pesquisa adequadas podem atrasar a conduta de um esquema pós-exposição em indivíduos agredidos, levando-os muitas vezes à morte.

Estudos indicam que a detecção de antígenos da raiva através da técnica de imuno-histoquímica é mais sensível que a detecção de Corpúsculos de Negri visualizados pela coloração de hematoxilina-eosina (HE) e tão sensível quanto à imunofluorescência direta (14). Outros estudos ainda indicam uma maior sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica em relação à IFD (15).

Outra vantagem apresentada pela técnica de imuno-histoquímica é a segurança do pessoal de laboratório que trabalha diretamente com as amostras a serem analisadas, pois, a amostra colocada em solução de formol a 10%, torna o vírus inativo. Após a fixação do material nessa solução e embocamento em parafina, esse material pode ser manipulado sem maiores riscos. Além disso, o material conservado em parafina fica preservado por tempo ilimitado, possibilitando assim estudos retrospectivos, o que é mais difícil em amostras congeladas, devido aos vários congelamentos e descongelamentos do material, o que pode muitas vezes resultar na inviabilidade da amostra.

No presente estudo pôde-se comprovar a eficácia da reação imuno-histoquímica no diagnóstico da raiva, sendo essa técnica, mais uma ferramenta que pode ser empregada para que se alcance uma melhor notificação da doença e assim, a adoção de medidas de controle.

REFERÊNCIAS

1. COLEMAN, PG; FÈVRE, EM; CLEAVELAND, S. Estimating the Public Health Impact of Rabies. *Emer. Inf. Dis.*, 2004; vol.10, nº 1: 140-143.
2. FINKE, S; CONZELMANN, K. Replication strategies of rabies virus. *Virus Res.*, 2005; 111:120-131.
3. WHO (World Health Organization). *Human and animal rabies*. Geneva, 2004.
4. RUPPRECHT, CE; HANLON, CA; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. *THE LANCET Inf. Dis.*, 2002; 2: 327-343.

5. BRASS, D. A. Monoclonal antibody characterization of bat-rabies isolates. In: BRASS, D. A. Rabies In Bats: Natural History and Public Health Implication. USA, 1994, p. 189-206.
6. KOTAIT, I.; CARRIERI, ML; CARNIELLI Jr, P; CASTILHO, JG; OLIVEIRA, RN; ACHKAR, SM. *et al.* Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. *Bol. Epidemiol. Pta.*, 2007; 4: 2-8.
7. DEAN, DJ, ABELSETH, MK, ATANASIU, P. Fluorescent antibody test. *In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies.* Geneva, World Health Organization, 1996.
8. KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. *In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies.* Geneva, World Health Organization, 1996.
9. WEBSTER, WA. & CASEY, GA. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: Meslin, F-X; Kaplan MM; Koprowski H. Laboratory techniques in rabies, 4ed., Geneva: World Health Organization, 1996: p. 96-104.
10. DIAZ AM; PAPO S; RODRIGUEZ A; SMITH JS. Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin America and the Caribbean. *Zentr. Vet. B*, 1994; 41: 153-60.
11. TORDO N., BOURHY H., SACRAMENTO D. PCR technology for *Lyssavirus* diagnosis. In: Clewley J, ed. *The polymerase chain reaction (PCR) for human viral diagnosis.* London, CRC Press, 1995: 125-145.
12. CARRIERI, ML; MATTOS, CA; CARNIELI JR. P; MATTOS, C; FAVORETTO, SR; KOTAIT, I. Canine and feline rabies transmitted by variant 3 *Desmodus rotundus* in the state of São Paulo, Brazil. . In: Seminário Internacional Morcegos como transmissores da raiva, São Paulo, 2001. Programas e Resumos, p. 51-52.
13. HSU SM; RAINE L; FANGER H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Hist. Cytochem*, 1981; v.29, 4: 577-580.
14. WOLDEHIWET Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. *Clin. Chimica Acta*, 2005; 351: 49-63.
15. BOURGAN AR & CHARLTON KM. The demonstration of rabies antigen in paraffin-embedded tissues using the peroxidase-antiperoxidase method: a comparative study. *Can. J. Vet. Res.*, 1987; 51: 117-20.