

## **A UTILIZAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DE RAIVA**

Sandra Davi Traverso<sup>1</sup>, Elaine Melchiorretto<sup>2</sup>, Aldo Gava<sup>3</sup>, Claudia Salette Wisser<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Orientador, Departamento de Medicina Veterinária, CAV – sandra.traverso@udesc.br.

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, CAV - bolsista PROBIC/UDESC

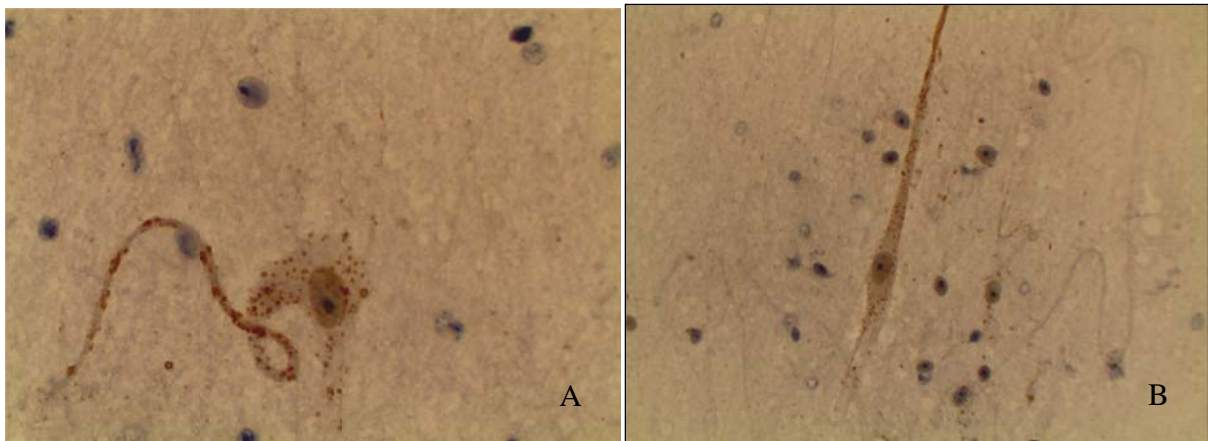
<sup>3</sup> Professor Participante, Departamento de Medicina Veterinária, CAV

<sup>4</sup> Doutorando em Ciência animal, CAV

Palavras-chave: encefalite viral, fixação, teste rápido.

A raiva é uma doença viral, infecciosa, de notificação obrigatória, invariavelmente fatal, que afeta o sistema nervoso central de pessoas e de quase todas as espécies de mamíferos domésticos e silvestres. É considerada uma das zoonoses de extrema importância em Saúde Pública, não só por sua evolução letal, como também por seu elevado custo social e econômico. Os métodos de diagnóstico para a raiva recomendados pela Organização Mundial da Saúde são a imunofluorescência direta (IFD) e a prova biológica de inoculação intracerebral em camundongos por sua alta sensibilidade e especificidade. Contudo outras técnicas vêm sendo estudadas em vários países no mundo. Entre elas destacam-se a imunocitoquímica e o processamento em micro-ondas doméstico para imunohistoquímica. Essas técnicas tem demonstrado bons resultados e tem em comum a rapidez na execução. A confirmação do diagnóstico através de testes rápidos visa principalmente medidas profiláticas e minimização do risco de contágio aos humanos. O objetivo desta pesquisa é aprimorar a técnica de imunocitoquímica (ICQ) para o diagnóstico de raiva. Para isso foram avaliadas duas diferentes porções do encéfalo e quatro diferentes fixadores, buscando eleger a melhor combinação para a confecção dos esfregaços. O projeto está em andamento e as etapas futuras do experimento têm como objetivo avaliar a influência do congelamento na positividade do teste e a eficácia em outras áreas do sistema nervoso central (córtex, óbex e medula) no processamento. Foram realizadas visitas a propriedades nas quais havia animais com suspeita clínica de raiva. Estes eram avaliados clinicamente e, se constatado quadro clínico característico, eram eutanasiados. Tanto os animais eutanasiados, quanto os mortos naturalmente eram necropsiados e em seguida, amostras de sistema nervoso central (SNC) eram coletadas em gelo para ICQ e IFD e em formol para histologia e imuno-histoquímica (IHQ). No mesmo dia ou pela manhã do dia seguinte realizava-se o esfregaço de porções do cerebelo e hipocampo, seguido da fixação da lâmina em formol, metanol, acetona ou etanol. A técnica foi aplicada utilizando o anticorpo poli clonal (Rabies polyclonal Chemicon #5199, Temecula, CA, Estados Unidos) na diluição 1:1000 em PBS (*phosphate buffered saline*). As lâminas foram incubadas com o complexo estreptavidina-peroxidase (LSAB2 Kit, Dako Nort America, Carpinteria, USA) e reveladas com cromógeno marrom DAB (DAB, Dako Nort America, Carpinteria, USA). A leitura das laminas foi realizada em microscópio óptico e estas foram classificadas quanto à marcação no citoplasma de neurônios em positivas ou negativas e intensidade de marcação. As amostras em formol eram processadas rotineiramente para

confirmação paralela de diagnóstico através da IHQ. O restante do material foi congelado, para análises posteriores na segunda etapa do experimento. Na primeira etapa, foram submetidas à imunocitoquímica 14 amostras, dessas 12 foram positivas para a imunocitoquímica em porções de cerebelo e hipocampo. A marcação foi observada na forma de granulações marrom no citoplasma de neurônios. A imunofluorescência direta foi positiva em 13 das 14 amostras. A amostra negativa na IFD foi submetida à inoculação intracerebral em camundongo, confirmando diagnóstico de raiva. O Falso negativo na ICQ pode ser explicado devido ao escasso número de neurônios presente nas lâminas desses esfregaços. Oito casos positivos de raiva foram testados com os quatro diferentes fixadores, não havendo diferença da positividade e na intensidade de marcação entre eles. Sendo assim o formol por ter capacidade de inativar o vírus da raiva, torna mais segura a manipulação das amostras, sendo o fixador eleito para os testes que serão realizados nas demais etapas do projeto. Duas amostras positivas para raiva, armazenadas durante 1 ano, foram submetidas novamente a ICQ, tendo resultado positivo, sinalizando a viabilidade da técnica também para amostras congeladas. Até o momento foram testadas duas regiões do SNC, cerebelo e hipocampo, por serem as áreas mais indicadas para os testes de imunofluorescência direta e nessas também não houve diferença na positividade e intensidade de marcação entre as amostras realizadas. A agilidade nas medidas de prevenção e controle através da aplicação de testes rápidos como a imunocitoquímica pode ajudar a minimizar perdas econômicas e risco de contaminação das pessoas envolvidas no surto da doença.



**Fig. 1** Raiva em bovino.: Marcação imunocitoquímica positiva no citoplasma de neurônios. A: fixação em formol. B: fixação em acetona.