

TÉCNICA DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA PAR A AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-RÁBICOS EM SOROS DE BOVINOS

II --- Estudo comparativo dos resultados da IFRA com os obtidos pela soroneutralização

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

RFMV-A/17

ISHIZUKA, M. M. et al. — *Técnica de imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos. II — Estudo comparativo dos resultados da IFRA com os obtidos pela soroneutralização. Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 11:147-53, 1974.*

RESUMO: Foram examinadas 125 amostras de soros de bovinos pelas provas de SN e IFRA, dos quais 63 positivos e 47 negativos a ambas as provas, e 15 foram positivos a IFRA e negativos a SN.

A análise estatística dos resultados revelou:

1. a associação positiva significativa entre os resultados obtidos por ambas as provas, expressa pelo coeficiente de associação de Yule que foi igual a 1;
2. os resultados apresentaram boa concordância e a IFRA parece ser mais sensível que a SN posto que os 15 soros SN- e IFRA+ eram de animais vacinados;
3. a correlação existente entre os resultados foi de baixa intensidade (0,33), embora positiva e significativa ao nível de rejeição de 5% estabelecido.

Isto talvez se deva à natureza diversa dos anticorpos medidos por ambas as provas sem afastar a hipótese da maior sensibilidade da IFRA.

A correlação foi medida pelo coeficiente de correlação de Spearman e a significância pelo teste "t" de Student.

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

* Professor Assistente Doutor.

** Técnico de Laboratório.

I — INTRODUÇÃO

Em trabalho anterior³ (1974) cuidamos da adaptação da prova de Imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos. Tal adaptação foi conseguida introduzindo-se algumas modificações na técnica de THOMAS et al.⁸ (1963), que foram: tratamento dos decalques de corno de Ammon de cão, sabidamente ricos em corpúsculos de Negri, com solução de sacarose 0,15 M durante 30 minutos a 37°C; suspensão de vírus fixo CVS a 40% e fracionamento de soro de bovino normal pela cromatografia em coluna de DEAE-CELLULOSE.

O presente trabalho cuida da comparação dos resultados obtidos com a prova de Imunofluorescência indireta relativamente aos encontrados com a prova de Soroneutralização.

De acordo com a hipótese de nulidade, não haveria relação entre os resultados obtidos pela IFRA e SN. Evidentemente, nossa hipótese de trabalho admitia relação positiva entre ambas. Fixamos em 0,05 o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

II — MATERIAL E MÉTODOS

Soros:

Foram testadas 125 amostras de soros, pertencentes a 40 bovinos adultos. As amostras de soros foram obtidas antes da vacinação dos animais com uma única dose de vacina anti-rábica e 90, 180, 270 e 390 dias decorridos da vacinação.

A Tabela 1 resume o número de soros colhidos em cada oportunidade.

Cada soro foi repartido em duas porções, destinando-se uma delas à prova de SN e a outra à prova de IFRA.

TABELA 1

Soros de bovinos, segundo o número de dias decorridos da vacinação. São Paulo, 1972.

N.º de dias decorridos da vacinação	Freqüência
Zero	40
90	22
180	18
270	12
390	33
Total	125

Provas sorológicas:

A prova de SN foi realizada pelo Instituto Merieux de Lyon, segundo a técnica descrita por ATANASIU¹ (1967).

A prova de IFRA obedeceu à técnica por nós elaborada e descrita no trabalho anterior (ISHIZUKA et al.³).

III — RESULTADOS

Para um primeiro exame do problema, procuramos estudar o comportamento dos soros diante de ambas as provas, procurando em cada caso os resultados positivos e negativos.

Para tanto, impôs-se o estabelecimento de critérios no sentido de permitir classificar os soros de forma inequívoca como possuindo ou não anticorpos anti-rábicos. Assim, resolvemos classificar como positivos soros que, submetidos à prova de SN apresentassem logaritmo na base 10 do título, igual ou maior que 0,7.

Idêntico critério foi adotado relativamente à prova de IFRA, ou seja, foram considerados positivos os soros que quando diluídos pelo menos a 1:5, determinassem o aparecimento de corpúsculos fluorescentes. Os resultados obtidos figuram na Tabela 2.

TABELA 2

Soros de bovinos, segundo resultados das provas de IFRA e SN. São Paulo, 1972.

IFRA \ SN	Reagente	Não reagente	Total
Reagente	63	0	63
Não reagente	15	47	62
Total	78	47	125

O coeficiente de associação de Yule, calculado segundo MARASCUILLO⁶ (1971) para os dados obtidos na Tabela 2, mostrou-se igual a 1 (hum), sendo que as provas apresentaram resultados concordantes em 110 soros (88%) e nos restantes 15 (12%) foram positivos pela IFRA e negativos pela SN.

O valor de X^2 (Qui quadrado), calculado em base aos dados da Tabela 2, foi igual a 77,66 que, comparado ao valor crítico de X^2 , para 1 grau de liberdade, foi significativo, ultrapassando de muito o valor para o nível de rejeição adotado.

Proseguindo no estudo comparativo dos dois métodos, estudamos a correlação dos resultados obtidos, valendo-nos para tanto apenas dos dados referentes aos soros positivos, dosados por ambos os métodos, conforme consta na Tabela 3.

Para o cálculo desta correlação preferimos empregar método estatístico não pa-

ramétrico, calculando o coeficiente de correlação de SPEARMAN, segundo MARASCUILLO⁶ (1971), que forneceu valor igual a 0,33, indicando a existência de correlação positiva entre ambos os métodos, não obstante ser de pequena magnitude. Esta correlação, entretanto, mostrou-se significativa ao nível de rejeição adotado de 5%, dando para a estatística "t" de Student valor igual a 2,74 (o valor de "t" para o nível de rejeição adotado é igual a 1,96).

IV — DISCUSSÃO

No tocante à comparação das provas de SN e de IFRA, a Tabela 2 indica que os resultados apresentam boa concordância e que a IFRA parece ser mais sensível do que a SN, posto que os 15 resultados, positivos à primeira das provas e negativos à segunda, referiam-se a animais que haviam sido vacinados.

O estudo da correlação medida pelo coeficiente de correlação de Spearman mostra a existência de uma correlação positiva significativa entre os resultados obtidos por ambas as provas.

A correlação obtida não é, entretanto, elevada, condição que talvez dependa da natureza diversa dos anticorpos medidos por uma e por outra prova, não sendo possível afastar a hipótese de que a IFRA apresente sensibilidade superior a da SN, fato este, aliás, já assinalado por outros autores (LARSH⁴ (1965); LEFFINGWELL & IRONS⁵ (1965); GISPEN & SASTHOF² (1965) e PECK⁷ (1966).

A técnica de IFRA, desde que se disponha de um microscópio de fluorescência, mostrou-se mais rápida, simples e menos dispendiosa que a clássica SN, pois dispensa o uso de animais e o resultado pode ser obtido em pouco mais de duas horas.

ISHIZUKA, M. M. et al. — Técnica de imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos. II. Estudo comparativo dos resultados da IFRA com os obtidos pela soroneutralização. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11: 147-53, 1974.



Fig. 1 — Soro de bovino, submetido à prova de IFRA sobre decaique de corno de Ammon de cão raivoso, sem tratamento pela sacarose 0,15 M.

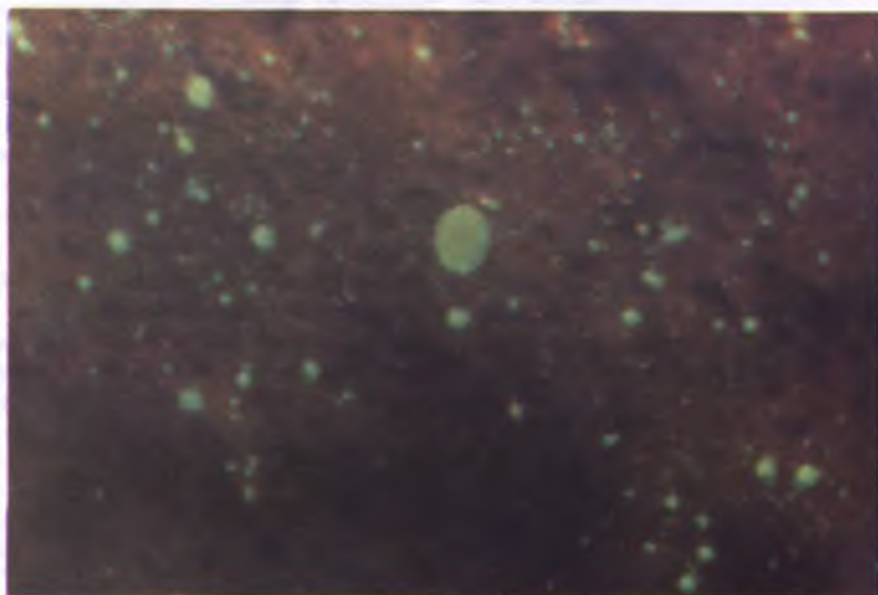


Fig. 2 — Soro de bovino, submetido à prova de IFRA sobre decalque de corno de Ammon de cão raivoso, com tratamento pela sacarose 0,15 M.

ISHIZUKA, M. M. et al. — Técnica de imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos. II. Estudo comparativo dos resultados da IFRA com os obtidos pela soroneutralização. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11: 147-53, 1974.



Fig. 3 — Decalque de corno de Ammon de cão raivoso submetido à prova de Imunofluorescência direta.

TABELA 3
Soros de bovinos, segundo títulos de anticorpos antirábicos medidos pelas provas de IFRA e SN. São Paulo, 1972.

Titulo por IFRA	Logaritmo do titulo por SN	Titulo por IFRA	Logaritmo do titulo por SN	Titulo por IFRA	Logaritmo do titulo por SN
5	0,70	5	1,50	25	1,42
5	0,70	5	1,65	25	1,46
5	0,80	5	1,70	25	1,46
5	0,80	5	1,80	25	1,47
5	0,80	5	1,82	25	1,47
5	0,86	5	1,87	25	1,50
5	0,87	25	0,90	25	1,50
5	1,00	25	0,90	25	1,60
5	1,00	25	0,90	25	1,60
5	1,00	25	0,90	25	1,70
5	1,12	25	0,90	25	1,78
5	1,14	25	1,00	25	1,80
5	1,15	25	1,00	25	1,80
5	1,15	25	1,00	25	1,85
5	1,18	25	1,05	25	2,07
5	1,18	25	1,18	25	2,10
5	1,20	25	1,18	125	0,70
5	1,25	25	1,22	125	0,90
5	1,40	25	1,25	125	1,47
5	1,50	25	1,30	125	1,50
5	1,50	25	1,35	125	1,85

ISHIZUKA, M. M. et al. — Técnica de imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos. II. Estudo comparativo dos resultados da IFRA com os obtidos pela soroneutralização. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11: 147-53, 1974.

Parece ser ainda mais sensível permitindo detectar níveis de anticorpos imperceptíveis à SN, não apresentando resultados

falsos positivos. Todas estas características a torna recomendável para o uso em rotina.

RFMV-A/17

ISHIZUKA, M. M. et al. — *Indirect fluorescent antirabies technique (IFRA) in bovine serum. II — Comparison of the results obtained with IFRA and serum-neutralization test.* *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11:147-153, 1974.

SUMMARY: *There were test 125 bovine blood samples by the SN and IFRA techniques, among them 63 were positives and 47 negatives to both and 15 were positives so IFRA and negatives to SN.*

The statistical analysis of the results revealed:

- 1. a significant positive association between the results obtained of both techniques, analysis by the Yule association coeficient ($Q = 1$);*
- 2. the agreement of the antibodies title was good and the IFRA seems to be more sensitive than the SN, based on the 15 seruns that were positive to IFRA and negative to SN. These 15 serums samples belows to vaccinated animals;*
- 3. the correlation among the titles was low (0,33) but it was positive and significant at the level of rejection of the null hipothesis that was fixed at 5%.*

This low value is probably due to the different nature of the antibodies measured by the two studied techniques considering too the highest sensibility of the IFRA.

UNITERMS: *Rabies*; Serum neutralization test*; Indirect fluorescent test*.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATANASIU, P. — Titrage des anticorps rabiques pratiqué sur les serums humaines. *Bull. Off. int. Epizoot.*, 67 (3/4):383-7, 1967.
2. 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, 1955.
3. ISHIZUKA, M. M. et al. [prelo].
4. LARSH, S. E. — Indirect fluorescent antibody and serum neutralization response in pre-exposure profilaxis against rabies. *Ann. intern. Med.*, 63(6):955-64, 1965.
5. 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.
6. MARASCUILLO, L. A. — *Statistical methods for behavioral science research.* New York, McGraw-Hill, 1971.
7. PECK, F. B. (Jr.) — The detection of human rabies antibody by the indirect

ISHIZUKA, M. M. et al. — Técnica de imunofluorescência indireta para a avaliação de anticorpos anti-rábicos em soros de bovinos. II. Estudo comparativo dos resultados da IFRA com os obtidos pela soroneutralização. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, **11**: 147-53, 1974.

fluorescence test. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RABIES, Talloires, 1965. *Proceedings*. Basel, Karger, 1966. v. 1, p. 201-6.

ques for detection of rabies antibody in human sera. *J. Immunol.*, **91**: 721-3, 1963.

8. THOMAS, J. B. et al. — Evaluation of indirect fluorescent antibody technl-

Recebido para publicação em 28-8-74
Aprovado para publicação em 29-8-74