MÉTODO SUBSTITUTIVO PARA PRODUÇÃO DE INSUMO UTILIZADO NA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA O DIAGNÓSTICO DA RAIVA: IN VIVO PARA IN VITRO. GARCIA, J.G.*; ACHKAR, S.; FREITAS, F.C.; MACEDO, C.I.; CAPORALE, G.M.M. Instituto Pasteur, Av. Paulista, 393, Cerqueira César, CEP 01311-000, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: graciecaporale@yahoo.com.br. ***Substitute method for input production used in the direct immunofluorescence technique: in vivo for in vitro.***

A utilização de controles de especificidade em testes de imunofluorescência direta (IFD) para o diagnóstico em sistema nervoso central (SNC) de animais suspeitos de infecção pelo vírus da raiva vem sendo recomendada há décadas. Muitos laboratórios ainda utilizam como diluente para o conjugado fluorescente e como controle de especificidade das reações de IFD, insumo de SNC de camundongos infectados com o vírus CVS (*Challenge Virus Standard*). A necessidade da utilização desse controle dependerá da metodologia empregada para a produção do conjugado. A utilização de camundongos para esse fim não é condizente com as Normas de Ética Animal, que recomenda a substituição de procedimentos in vivo para in vitro, sempre que possível. O objetivo deste estudo foi comparar a utilização de suspensão de vírus CVS produzido em linhagens de células BHK-21 (Baby Hamster Kidney) e N2A (Neuroblastoma Murino), para a substituição do uso de SNC de camundongos como diluente do conjugado. Foram preparados dois lotes de vírus, e obtido um volume total de 450 mL de sobrenadante de cada lote, sendo 60 mL de cada um concentrado em Amicon®, para a obtenção das partículas íntegras do vírus. A titulação foi realizada na razão 2 pelo teste de IFD, em cultura de células BHK-21 e N2A. Após a colheita dos sobrenadantes, as células foram lisadas para a obtenção de ribonucleoproteínas. Para a obtenção de diluente a partir da infecção das células BHK-21 e N2A utilizaram-se 15 mL de lisado celular e 100 µL de partículas virais concentradas. Foi utilizado para o teste de IFD o conjugado antirribonucleoproteína produzido no Instituto Pasteur (IP) com título de 1:200. Como diluentes controle para o conjugado foram utilizados o diluente produzido com suspensão a 20% de SNC de camundongos infectados e os diluentes preparados a partir de cultura de células. Os resultados obtidos após a titulação do vírus produzido em células BHK-21 e N2A foram de 1:512 e 1:4096 do sobrenadante coletado, e de 1:32.768 e 1:83.886 após a concentração em Amicon®. Obteve-se 100% de neutralização do conjugado diluído com suspensão de SNC pelo teste de IFD. Quando utilizados os diluentes preparados a partir das culturas de células N2A e BHK-21, foi possível a neutralização de 100% do conjugado, aumentando-se as concentrações de diluente em 2 e 4 vezes, respectivamente. A partir dos resultados obtidos com os lotes de diluentes produzidos, verificou-se que o desempenho do protocolo de replicação viral em N2A foi melhor do que em BHK-21, embora os dois tenham sido satisfatórios. Estes resultados demonstram a viabilidade da substituição do método atualmente realizado in vivo para in vitro. Esta inovação metodológica atende às Normas de Ética Animal, e evidencia que sempre há caminhos na ciência para diminuir ou eliminar o uso de animais de laboratório.

*Bolsista: Programa de Aprimoramento Profissional-PAP/IP