

**Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo  
Instituto Pasteur de São Paulo**

**Análise Crítica da Técnica de Imunofluorescência  
Direta no Diagnóstico Laboratorial da Raiva do  
Instituto Pasteur de São Paulo**

**Nathalia de Barros Salvino Alves**

**Trabalho apresentado para Conclusão de  
Curso do Programa de Especialização  
Profissional em Vigilância Laboratorial da  
Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo**

**Orientadora: Samira Maria Achkar  
Pinheiro**

**São Paulo  
2020**

**Análise Crítica da Técnica de Imunofluorescência  
Direta no Diagnóstico Laboratorial da Raiva do  
Instituto Pasteur de São Paulo**

**Nathalia de Barros Salvino Alves**

**Trabalho apresentado para Conclusão de  
Curso do Programa de Especialização  
Profissional em Vigilância Laboratorial da  
Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo**

**Orientadora: Samira Maria Achkar  
Pinheiro**

**São Paulo**

**2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca do Instituto Pasteur – SES/SP

A474 Alves, Nathalia de Barros Salvino

Análise crítica do diagnóstico laboratorial da raiva no Instituto Pasteur de São Paulo. / Nathalia de Barros Salvino Alves. – São Paulo, 2020.

45 f. : il.

Monografia (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Instituto Pasteur, São Paulo, 2020.

Programa de Especialização em Diagnóstico Laboratorial da Raiva.

Orientação: Dra. Samira Maria Achkar Pinheiro

1. Raiva/diagnóstico. 2. Imunofluorescência. I. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Instituto Pasteur. II. Título.

NLM WC550

FC-05/2020

## **Dedicatória**

Aos meus pais, meu alicerce e principais incentivadores, que sempre acreditaram na concretização dos meus sonhos, sonhos aqueles, que em minha visão de jovem aprendiz da vida, seriam para sempre intangíveis, nunca me permitiram desistir.

Ao meu grande amigo de 4 patas, Lucio, pelos 14 anos de amizade, principal motivador para que eu caminhasse na linda jornada da Medicina Veterinária e que com um olhar tem o poder de curar todas as minhas tristezas.

## **Agradecimentos**

Ao CEFOR-SP pela bolsa concedida, ao Instituto Pasteur e todos os funcionários que colaboraram com meu aprendizado.

À minha orientadora Samira Achkar, por todo carinho, amizade, dedicação, exemplo de pessoa, onde seriedade e leveza fazem anastomose.

Ao Enio Mori, por toda ajuda no setor de virologia, leitura de lâminas de IFD, e sempre estar disposto a ensinar.

Ao Vilar Gewehr, que gentilmente se dispôs a fotografar as lâminas do trabalho.

À Juliana Castilho, Graciane Caporale, Carla Macedo e Micheli Cochi, por terem disponibilizado dados e outros auxílios prestados.

À Raphaela Zamudio, que com sua doçura apareceu como um abraço bom, no momento certo, obrigada por gostar da minha loucura, por todos os almoços, foi mais fácil com você.

À Mariana Cardoso, presente lindo que ganhei, você foi muito mais que uma dupla de setor, obrigada pela parceria, pela convivência diária, pelo apoio, carinho, risadas, obrigada por me surpreender, amiga.

À Vitória Bueno, por toda companhia, todo otimismo, exemplo de determinação.

À todos que de alguma forma colaboraram mas não foram citados, minha gratidão.

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

1 Coríntios 13

Alves NBS. Análise Crítica da Técnica de Imunofluorescência Direta no Diagnóstico Laboratorial da Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo [ Trabalho de Conclusão de Curso – Programa de Especialização Profissional em Vigilância Laboratorial da Raiva]. São Paulo: Instituto Pasteur de São Paulo; 2020.

## RESUMO

Embora a Organização Mundial da Saúde preconize a técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) como padrão ouro para o diagnóstico laboratorial da raiva, fatores externos podem influenciar o limiar de detecção do antígeno viral, como a conservação da amostra, a estrutura laboratorial, os insumos utilizados e o treinamento dos profissionais. O objetivo deste estudo foi analisar criticamente a técnica de IFD no Laboratório de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur, a fim de detectar eventuais fatores externos que possam limitar ou diminuir sua acurácia, visto que o resultado laboratorial tem papel determinante na tomada de decisão quanto ao tratamento de indivíduos expostos ao risco de infecção pelo vírus da raiva. Foram analisados os dados todas as amostras de sistema nervoso central (SNC) de animais suspeitos de infecção pelo vírus da raiva, recebidas durante o ano de 2019, além de uma avaliação prática de 300 amostras dos procedimentos laboratoriais relacionados à IFD no qual avaliou-se a fixação do tecido, bem como os diluentes controles para o uso do conjugado. Pode-se inferir que a fixação das lâminas sob ambas condições (temperatura ambiente e a -20°C) demonstrou equivalência em relação à qualidade do tecido analisado. Todos os sistemas utilizados para diluição do conjugado apresentaram eficácia ficando evidente a viabilidade da substituição de suspensão de CVS produzido *in vivo* para *in vitro*. Ao analisar os resultados da IFD negativos, houve concordância de 99,9% com as demais técnicas aplicadas. A sensibilidade e especificidade da técnica de IFD foram avaliadas em relação aos resultados obtidos dentre todas as demais metodologias complementares conjuntamente, com sensibilidade de 94,3%, especificidade de 99,9% e acurácia de 99,8%. Em relação a intensidade de fluorescência de fragmentos de SNC de herbívoros positivos avaliados, observou-se que fragmentos de cerebelo e tronco encefálico apresentaram um ligeiro aumento na intensidade das células infectadas em relação ao hipocampo e córtex cerebral.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO/OBJETIVO</b> .....	8
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	14
3.1 DADOS LABORATORIAIS .....	14
3.1.1. ANÁLISE DOS PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS E DA TÉCNICA DE IFD .....	15
<b>4. RESULTADOS</b> .....	18
4.1. AVALIAÇÃO PRÁTICA DA TÉCNICA DE IFD .....	20
4.1.1 RESULTADOS DAS TÉCNICAS LABORATORIAIS .....	23
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	39
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	43
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	45

## 1. INTRODUÇÃO/OBJETIVO

A raiva é uma antropozoonose causada por um lyssavírus, mantida por carnívoros e quirópteros, e ainda é considerado um grave problema de saúde pública, mesmo com o advento da vacina (COLEMAN, 2004). Possui neurotropismo provocando uma encefalite viral aguda com alta letalidade. Seu agente causador é um vírus RNA de fita simples do gênero *Lyssavirus*, pertencente à família *Rhabdoviridae*, ordem Mononegavirales, espécie *rabies lyssavirus* (RABV) (ICTV, 2018).

O ciclo urbano da doença tem como principal transmissor o cão, que é importante para a saúde pública pelo estreito contato com o homem (MURPHY, 1985). O ciclo silvestre se mantém do mesmo modo que o anteriormente citado, no entanto, tem como reservatórios animais terrestres silvestres e os quirópteros (ACHA e SZYFRES, 2003).

O RABV apresenta variações antigênicas e genéticas, e estas diferenças encontradas entre os reservatórios, são chamadas de variantes (TEIXEIRA *et al.*, 2005), sendo que, com a utilização do painel de anticorpos monoclonais estabelecido pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ou através de técnicas moleculares é possível estabelecê-las. Esta determinação é de extrema importância para uma efetiva vigilância epidemiológica (KOTAIT *et al.*, 2009), entretanto, o diagnóstico primário, o qual é realizado por meio da técnica de Imunofluorescência direta (IFD) é fundamental para que as ações de vigilância sejam prontamente estabelecidas (DEAN *et al.*, 1996).

O diagnóstico laboratorial da raiva é uma das principais ferramentas para direcionar o programa de controle da doença, visto que com os resultados laboratoriais podem ser estabelecidas medidas profiláticas, bem como o monitoramento de áreas geográficas acometidas. A ausência de um diagnóstico laboratorial pode atrasar a conduta de um esquema pós-exposição em indivíduos agredidos, levando-os muitas vezes à morte. Todos estes aspectos levam a uma subnotificação da doença (RUPPRECHT *et al.*, 2018).

O Laboratório de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo (IP) é referência Nacional para o diagnóstico da raiva, além de colaborador da Organização Panamericana de Saúde (OPAS) (VIEIRA *et al.*, 2014). Anualmente são processadas cerca de sete mil amostras de sistema nervoso central (SNC) de animais suspeitos de infecção pelo vírus da raiva, além de eventuais amostras provenientes de humanos suspeitos tanto para diagnóstico *ante mortem* como *post mortem*. Além disso, está preconizado que toda amostra positiva proveniente de humanos, animais silvestres e de cão ou gato de área indene deve ser encaminhada para o IP para a identificação viral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). A abrangência em relação à demanda de amostras processadas rotineiramente no IP é estadual. Os procedimentos laboratoriais aplicados para o diagnóstico laboratorial da raiva no IP são baseados no *United States Protocol for postmortem diagnosis of rabies in animals by direct fluorescent antibody testing* (RUPPRECHT *et al.*, 2018).

No estado de São Paulo (ESP) a raiva tem caráter endêmico, e acomete especialmente animais de produção e morcegos, entretanto, canídeos e felídeos domésticos têm sido diagnosticados positivos em áreas urbanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Áreas anteriormente consideradas controladas, em relação à raiva canina, atualmente são consideradas de potencial risco, principalmente devido à presença de morcegos (CASTILHO *et al.*, 2018).

Embora a Organização Mundial da Saúde (OMS) preconize a técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) como padrão ouro para o diagnóstico da raiva, fatores externos podem influenciar o limiar de detecção do antígeno viral, como a conservação da amostra, os insumos utilizados e as condições dos equipamentos, assim, deve-se minimizar eventuais fatores externos que possam limitar ou diminuir a acurácia da técnica de IFD.

O diagnóstico laboratorial de amostras de SNC suspeitas deve ter acurácia e prazo para a execução, visto que medidas de profilaxia em indivíduos envolvidos dependem do mesmo. Além disso, o fato da raiva ser uma zoonose com alto grau de letalidade, é fundamental que amostras com baixa carga viral ou mesmo que estejam em avançado grau de decomposição sejam submetidas à outras técnicas laboratoriais, concomitantemente à IFD, como o isolamento viral em cultura de células (IVCC) e a RT-PCR seguida de sequenciamento genético. Por fim, estes procedimentos devem ser realizados em tempo hábil (CASTILHO *et al.*, 2018).

Diante do exposto, o presente estudo prospectivo visa analisar criticamente a técnica de IFD no IP, visto que o mesmo tem papel determinante para a tomada de decisão quanto ao tratamento de indivíduos expostos. Para tanto, os resultados da IFD em relação às demais técnicas utilizadas na rotina laboratorial serão utilizados como parâmetro para esta análise.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os primeiros estudos relacionados à imunofluorescência direta (IFD) datam de 1942, quando Albert Coons e col. demonstraram a marcação de anticorpos antipneumococos com fluoresceína em tecido pulmonar (COONS *et al.*, 1949). Posteriormente, em 1958, Goldwasser e Kissling a adaptaram para a detecção de antígenos virais da raiva no SNC (GOLDWASSER e KISSLINING, 1958). Em 1973 foi então modificada por Dean & Abelseth para o início da produção de conjugados obtidos a partir de concentrados de soros hiperimunes provenientes de anticorpos específicos através do tratamento com sulfato de amônia (PERRIN, 1996).

A fluoresceína é um corante marcador (fluorocromo) que absorve radiação (luz ultravioleta), e então quando excitado emite comprimento de onda maior (luz visível) (AOKI 2010). Para exercer sua função como marcadores na IFD, é necessário que os fluorocromos possuam grupos químicos capazes de formar ligações covalentes com moléculas proteicas, e assim emitir fluorescência visível e com coloração que seja diferenciada à do tecido em questão. O isotiocianato de fluoresceína (FITC) é o fluorocromo empregado ao conjugado para diagnóstico da raiva, e apresenta cor verde maçã, com um pico de absorção de 490nm e de emissão de 520nm (BEUTNER, 2003).

As reações de IFD podem aparecer de diferentes formas em relação à fluorescência: a *fluorescência específica*, que se deve à reação entre o substrato e a proteína marcada com o fluorocromo (reação antígeno-anticorpo); a *fluorescência não específica*, quando ocorre coloração dos tecidos por corante livre ou proteínas fluoresceinadas, e a *autofluorescência*, que ocorre devido à fluorescência natural dos tecidos (amarela, azul), quando expostos à luz ultravioleta (AOKI, 2014).

A Imunofluorescência Direta (IFD) é preconizada pela OMS como metodologia padrão ouro para diagnóstico confirmatório *post mortem* da raiva (DEAN *et al.*, 1996).

O conjugado é obtido a partir da conjugação do isotiocianato de fluoresceína (FITC) à anticorpos específicos purificados, os quais podem ser provenientes de

soros hiperimunes de animais imunizados, partículas inteiras do vírus, ribonucleoproteínas (RNP) purificadas ou ainda utilizando a tecnologia de hibridomas à produção de conjugados puros e específicos, a partir de anticorpos monoclonais (RUDD *et al.*, 2005). Sendo assim, conjugados produzidos utilizando soros de animais imunizados com RNP purificadas são os utilizados em maior escala para o diagnóstico, por apresentarem alta especificidade, já que a nucleoproteína é a mais conservada estruturalmente e mantém-se conservada em amostras fixas do vírus da raiva. (CAPORALE, 2010).

Outros reagentes utilizados para a execução da técnica de IFD são a acetona PA sendo seu uso preconizado a  $-20^{\circ}\text{C}$  e tem como função, a fixação das lâminas com *imprints* de SNC, e o tampão SST, que possui a função de diluente para o conjugado, além de lavagem das lâminas de IFD, e a glicerina utilizada na montagem das lâminas (DEAN *et al.*, 1996).

É necessário que o diagnóstico laboratorial tenha alta sensibilidade, especificidade e rápida execução, pois o resultado expresso está diretamente envolvido com as condutas profiláticas e epidemiológicas que serão posteriormente desenvolvidas. A IFD contempla todas essas especificações, comprovando ser, nos últimos 50 anos, um método ideal para o diagnóstico da raiva, é de suma importância salientar que além das práticas analíticas os fatores pré-analíticos colaboram para o bom desempenho da técnica (RUPRECHT *et al.*, 2018).

A coleta e o transporte do SNC para análise laboratorial devem ser realizados de forma que minimizem eventuais danos à amostra no ato de seu processamento. Informações referentes à espécie animal, histórico de exposição, sintomatologia clínica do animal, data de coleta, tipo de óbito, histórico de vacinação devem constar na documentação de encaminhamento da amostra (registro). As amostras devem ser encaminhadas sob refrigeração ou congelamento, preferencialmente o mais rápido possível a partir da data de coleta. Amostras em decomposição, com coloração esverdeada, liquefeita, podem impossibilitar a técnica ou gerar resultados não fidedignos (RUPRECHT *et al.*, 2018).

Todo material coletado para o diagnóstico da raiva deve ser considerado potencialmente infeccioso, assim, precauções durante a manipulação e o transporte devem ser tomadas (COSTA *et al.*, 2000). Todas as condutas laboratoriais devem ser exercidas dentro das normas de biossegurança, de acordo com as diretrizes

gerais para o Trabalho em Contenção com Material Biológico do Ministério da Saúde. Os *Rhabdovirus*, incluindo o vírus da raiva (amostras de vírus fixo), se enquadram em nível 2 (NB2), o que indica risco individual moderado e risco comunitário moderado, e em se tratando de amostras de rua, estão classificados como nível 3 (NB3), que indica risco individual elevado e baixo risco comunitário (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Exige-se que todo o pessoal do laboratório que desenvolverem práticas com materiais potencialmente contaminados mantenham a profilaxia periodicamente, por meio da dosagem de títulos de anticorpos (CDC, 2009).

O laboratório deve dispor de equipamentos de proteção coletiva (EPC) e individual (EPI). Por existir potencial risco de produção de aerossóis, a manipulação de amostras deve ser realizada em cabine de segurança biológica (CSB) certificada anualmente. A centrífuga deve conter caçapas individuais e apenas ser aberta pelo manipulador dentro da cabine de segurança, além de caixa de descarte de perfuro cortantes e lava olhos. Dentre os EPIs destacam-se o jaleco, as luvas e os óculos de proteção (WHO, 2004).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. DADOS LABORATORIAIS

Os dados referentes a todas as amostras recebidas para diagnóstico laboratorial da raiva no IP durante o ano de 2019, exceto as provenientes de humanos bem como as recebidas para tipificação genética foram incluídos neste estudo. Foi empregada uma planilha em programa Microsoft Excel<sup>®</sup> 2007 para o registro de informações referentes ao processamento de amostras, bem como aos dados públicos obtidos nas diferentes metodologias executadas na rotina laboratorial. As seguintes informações foram utilizadas:

(A) Registro no sistema de Gerenciamento de Ambiente Laboratorial (GAL) - foram utilizados os últimos números da etiqueta, e as siglas CAM, para amostras provenientes do município de Campinas e RP, para as amostras originárias de Ribeirão Preto.

(B) Espécie animal - foi descrita a espécie animal constante no cadastro da etiqueta do GAL.

(C) Estado de conservação da amostra – as amostras foram definidas em três categorias: *in natura* (FIGURA 1) quando mantidas sob condições de refrigeração ou congelamento antes do envio ao laboratório; em condições inadequadas (material ruim - MR) (FIGURA 2) quando recebidas em avançado estado de deterioração; e impossibilitadas (FIGURA 3), quando a amostra não apresentava condições de processamento em qualquer técnica diagnóstica, devido à ausência de material encefálico, ou devido à fixação ou ressecamento do mesmo.

(D) Resultados das técnicas laboratoriais - imunofluorescência direta (IFD); isolamento viral em cultivo celular (IVCC); isolamento viral em camundongos (IVC); reação em cadeia pela polimerase precedida pela transcrição reversa (RT-PCR), sequenciamento genético, e a Classificação morfométrica dos morcegos diagnosticados positivos na rotina laboratorial. Os resultados das técnicas foram extraídos dos protocolos de leitura e posteriormente conferidos no sistema GAL.

### 3.1.1 ANÁLISE DOS PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS E DA TÉCNICA DE IFD

Foi proposto um período de três meses (julho a setembro de 2019) para a verificação prática dos objetivos deste estudo. Seguindo dados do banco de registros do Laboratório de Virologia do IP, foi verificada que uma média semanal de 150 amostras eram recebidas para diagnóstico laboratorial na ocasião. Esta informação serviu de base para definir o quantitativo de amostras a serem avaliadas sob os parâmetros propostos, sendo assim, definiu-se um n=25 amostras semanalmente, totalizando 300 amostras no período proposto, independentemente da espécie animal e do estado de conservação da amostra. O critério de exclusão em relação aos morcegos foi definido de acordo com o tamanho do espécime, ou seja, animais com pouco material encefálico devido ao tamanho reduzido foram excluídos desta avaliação. A quantidade de lâminas processadas para cada amostra seguiu o fluxo atualmente estabelecido na rotina laboratorial, que se baseia na espécie animal, entretanto, como se trata de um estudo prospectivo, foi estabelecido o dobro do quantitativo de lâminas no ato do processamento, para que as lâminas utilizadas na rotina não fossem utilizadas nesta análise.

As lâminas de cada amostra foram confeccionadas com o mesmo fragmento de SNC e fixadas em acetona PA gelada de duas maneiras: em freezer a -20°C por 45 minutos, e à temperatura ambiente, por 1 hora. A presença de células do SNC nos campos das lâminas, foi definida no momento da leitura em microscópio de fluorescência, para avaliação da fixação.

Para a execução da técnica de IFD foi seguido o protocolo estabelecido por Dean em 1996, com a utilização de conjugado monoclonal antivírus da raiva comercial (Millipore MAB0051). O título foi previamente estabelecido em 1:160. O conjugado puro foi inicialmente diluído em Solução Salina Tamponada 0.01M ph 7.6 na diluição de 1:16. Foi definido que esta diluição seria preparada sempre no início da semana, sendo então utilizada ao longo dos dias para a execução das diluições de trabalho, as quais foram na proporção de 1:10.

As diluições de trabalho foram realizadas no momento da execução da técnica. De acordo com o número de lâminas, os volumes das diluições do

conjugado foram estabelecidos, sendo 25µL de conjugado diluído em solução de diluente e 25µL de conjugado diluído em suspensão de vírus fixo *Challenge Virus Standard* produzido *in vivo* (CVS 31/2) para cada lâmina. Durante um mês, os diluentes produzidos *in vivo* (cérebro de camundongos) e *in vitro* (células BHK-21) foram testados por meio da IFD, além de solução de diluente e SST. A utilização do diluente produzido *in vitro* seguiu o protocolo estabelecido por Garcia e col 2016, em que a concentração dos diluentes de CVS *in vitro* foram aumentados em 4 vezes, para a obtenção de 100% de neutralização do conjugado.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de epi-iluminação de fluorescência ZEISS SCOPE A1-AX10 (Zeiss®), filtro ultravioleta, com aumento de 400x, por dois observadores. Foram avaliados os seguintes parâmetros: controles positivos e negativos; inibição de fluorescência nos campos com CVS; densidade celular para avaliação da fixação do tecido cerebral; intensidade de fluorescência nos diferentes fragmentos de SNC de herbívoros analisados, segundo critérios estabelecidos por Carrieri (2006), sendo: (+) rara presença de antígeno com até 3 inclusões, (++) distribuição de antígeno espaçada com mais campos negativos; (+++) distribuição homogênea de antígeno por todo campo com poucos campos negativos; (+++++) distribuição de antígenos na maioria do campo sem campos negativos.

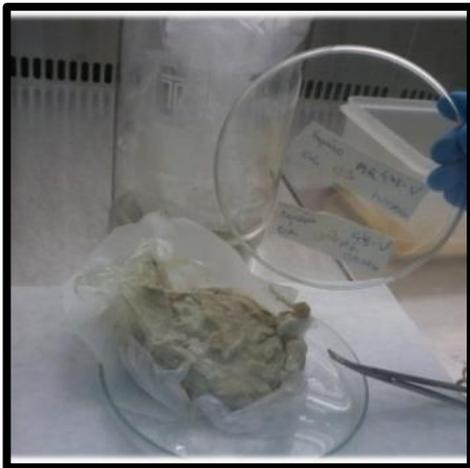
Os equipamentos, materiais e insumos utilizados direta ou indiretamente para a execução da técnica de IFD foram verificados, sob os registros em relação à manutenção, tempo de uso, temperatura, data de validade, eficácia, além da temporalidade das alíquotas dos reagentes e insumos, de acordo com a natureza de cada item.

Figura 1: Amostra de SNC de cão  
*in natura*



Fonte: Instituto Pasteur de SP

Figura 2: Amostra de SNC de cão  
deteriorado – MR



Fonte: Instituto Pasteur de SP

Figura 3: Morcego impossibilitado  
para diagnóstico.



Fonte: Instituto Pasteur de SP

### 3. RESULTADOS

Durante o período foram analisados os dados referentes às 7267 amostras (SNC e espécimes de morcegos) recebidas para diagnóstico laboratorial da raiva no IP, sendo o estado de conservação das amostras apresentado na Tabela 1. As amostras consideradas inadequadas para processamento (Material Ruim - MR) foram encaminhadas para diagnóstico por metodologia molecular (RT-PCR), conforme fluxo de encaminhamento estabelecido na rotina laboratorial do IP.

**Tabela 1:** Avaliação do estado de conservação das amostras recebidas para diagnóstico da raiva no Instituto Pasteur – Ano 2019.

Mês	Total de Amostras Processadas	Amostras <i>In Natura</i>	Amostras em Condições Inadequadas	Amostras Impossibilitadas
Janeiro	671	630	06	35
Fevereiro	489	462	08	19
Março	558	550	02	06
Abril	464	445	10	09
Maiο	756	737	08	11
Junho	424	416	04	04
Julho	573	554	05	14
Agosto	458	446	05	07
Setembro	474	464	07	03
Outubro	661	645	08	08
Novembro	821	794	09	18
Dezembro	918	890	06	22
TOTAL	7267	7033 (96.8%)	78 (1.07%)	156 (2,14%)

O IP é responsável em realizar o diagnóstico de amostras provenientes de diversos municípios do Estado de São Paulo, contudo, os municípios de Ribeirão Preto e Campinas realizam uma vigilância epidemiológica extremamente ativa, sendo responsáveis pelo encaminhando de cerca de 37% do total de amostras recebidas (Gráfico 2).



**Gráfico 2:** Amostras recebidas para diagnóstico da raiva no Laboratório de Diagnóstico da raiva no IP. ESP: Estado de São Paulo

Em relação aos equipamentos utilizados direta ou indiretamente na execução da técnica de IFD, observou-se que os mesmos atendem aos requisitos em relação à eficácia. A temperatura dos freezers, geladeiras e estufa é aferida regularmente; as cabines de segurança biológica (CSB) e o microscópio de fluorescência são submetidos à manutenção periódica. Em relação aos reagentes e insumos, não foi observado um controle em relação à temporalidade das alíquotas utilizadas. Foi sugerido o preparo semanal de SST para utilização nas lavagens das lâminas de IFD.

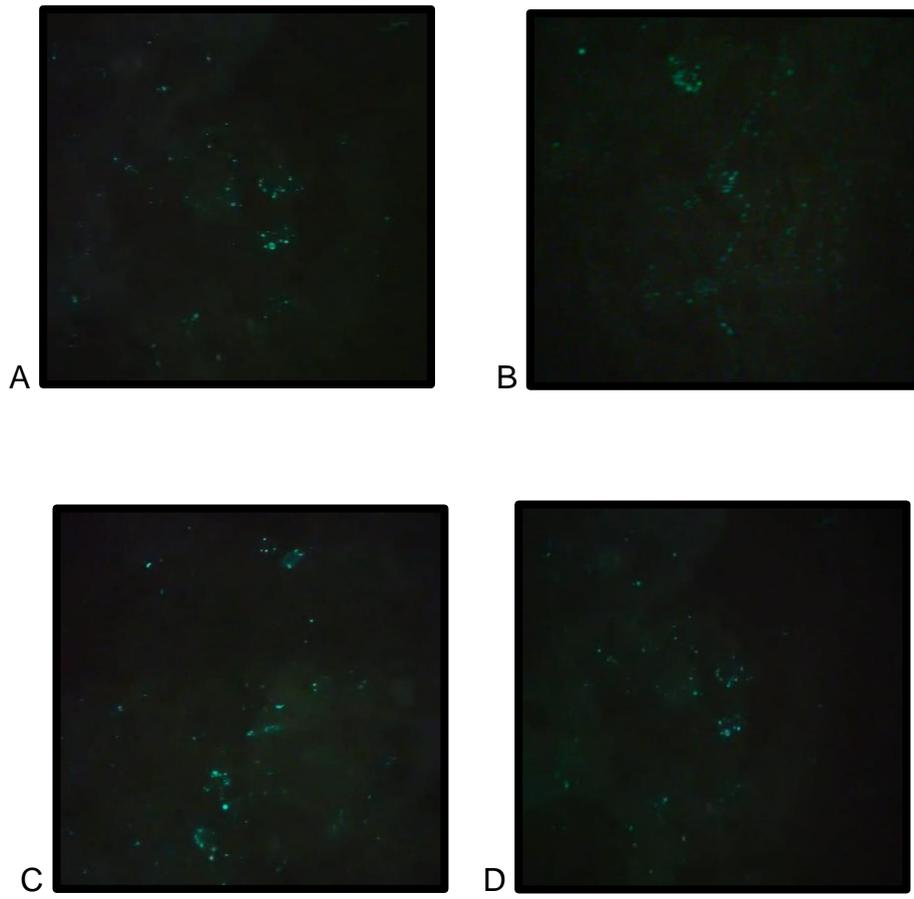
## 4.1 AVALIAÇÃO PRÁTICA DA TÉCNICA DE IFD

Para a avaliação prática da IFD sob os parâmetros propostos neste estudo, 300 amostras de SNC de animais de diferentes espécies (cães, gatos, ovinos, bovinos, equinos, saguis, morcegos) foram processadas concomitantemente à rotina laboratorial.

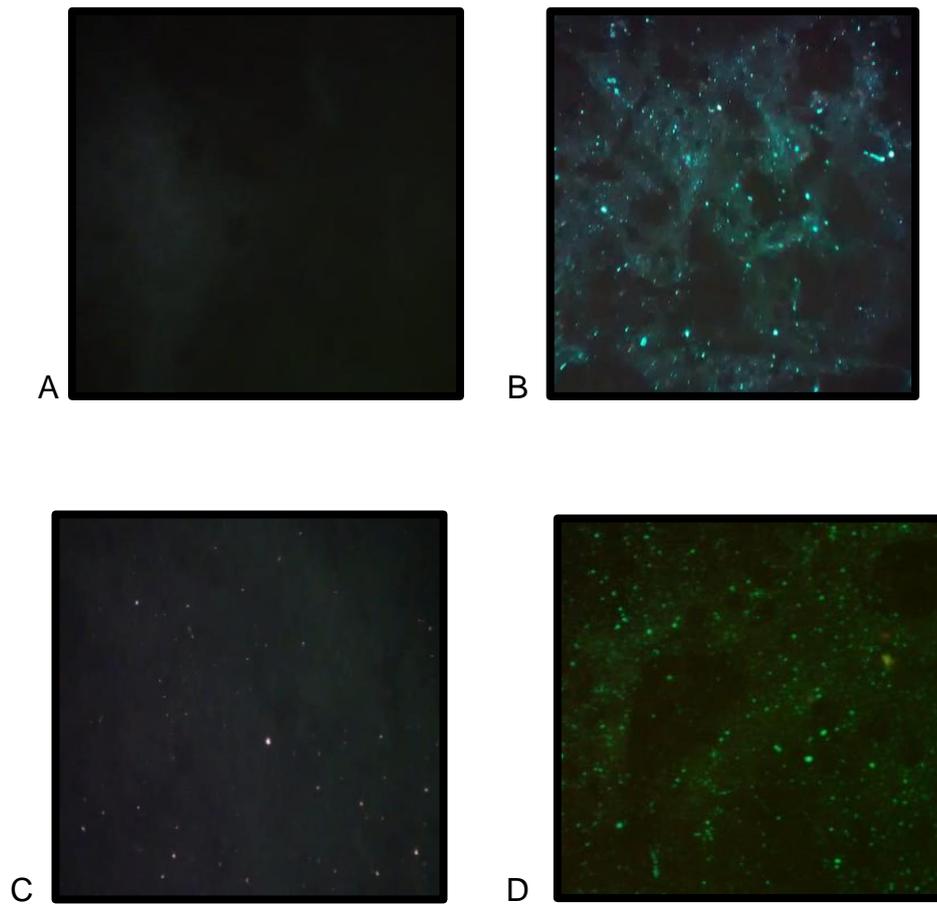
Em relação à avaliação da fixação em acetona PA gelada, ambos os procedimentos (em freezer e a -20°C) apresentaram similar eficácia. A densidade celular foi concordante ao se analisar o mesmo fragmento nas diferentes lâminas fixadas (FIGURA 4). A proposta de se fixar as lâminas à temperatura ambiente está relacionada ao acondicionamento dos *coplins* (cubas de vidro) no *freezer*, que pode causar derramamento de acetona no interior do equipamento, além do espaço reduzido para a disposição de vários *coplins* em momentos de rotina intensa.

Na avaliação da utilização do CVS produzido *in vivo* e *in vitro*, os resultados da leitura da IFD demonstraram concordância entre as lâminas testadas. Houve neutralização do conjugado (reação Antígeno-Anticorpo) diluído com suspensão de SNC de camundongos infectados bem como do diluente preparado a partir das culturas de células BHK-21 infectadas (FIGURA 5).

Quanto à intensidade de fluorescência nos fragmentos de SNC de herbívoros positivos, observou-se que fragmentos de cerebelo e tronco encefálico apresentaram um aumento na intensidade de células infectadas, com numerosos corpúsculos de inclusão de forma dispersa, em relação ao hipocampo e córtex. Em alguns fragmentos não foram visualizadas células infectadas nem mesmo material antigênico, entretanto, a positividade ocorreu nos demais fragmentos da mesma amostra (Tabela 2).



**Figura 4:** Amostra de SNC de Morcego positiva para a raiva por IFD. A/B: Tecido fixado em Acetona gelada à  $-20^{\circ}\text{C}$ . C/D: Tecido fixado em Acetona gelada à temperatura ambiente.



**Figura 5:** Amostra de SNC de bovino positivo para a raiva por IFD (GAL1901080003390). A/C: diluição de conjugado em suspensão de cérebro de camundongos infectados (A) e em suspensão de vírus produzido em cultura de células BHK21 (C). B/D: diluição de conjugado em solução de diluente (B) e em SST pH7.6 (D).

**Tabela 2:** Intensidade de fluorescência nos diferentes fragmentos de SNC de herbívoros positivos para a raiva – IFD. CA: Corno de Amon, CX: Córtex Cerebral, CB: Cerebelo, TE: Tronco Encefálico. NA: Não Avaliado.

Amostra	CA	CX	CB	TE
3537	+	+	+	++
3525	+++	+++	++++	++++
3609	++	++	+++	+++
3623	++++	++++	++++	++++
3624	++++	++++	NA	++++
3688	NA	+++	NA	+++
3309	++++	++++	++++	NA
3315	NA	+++	NA	NA
3318	NA	++++	NA	++++
3390	+++	+++	+++	+++
3476	+	+	+	+
3477	+++	+++	+++	+++
4090	+++	NA	+	NA
4110	NA	NA	+++	+++
4047	+++	+++	+++	NA
4072	NA	+++	+++	NA
4011	++	-	+	+
3973	NA	++	+++	+++
3911	+++	+++	+++	+++
3913	+++	+++		+++
3834	-	+	+	+
3804	-	-	+	++

#### 4.1.1. RESULTADOS DAS TÉCNICAS LABORATORIAIS

No período de janeiro a dezembro de 2019, 7111 amostras foram analisadas por meio da técnica de IFD, das quais 183 resultaram positivas, correspondendo à 2.6% do total analisado. As tabelas 03 a 14 demonstram estes resultados sendo possível comparar os resultados da IFD positiva com as demais técnicas diagnósticas aplicadas para cada amostra. O gráfico 3 reflete o total de diagnósticos positivos por espécie animal.

**Tabela 3:** Total de amostras positivas para a raiva – janeiro 2019. POS: Positivo; NEG: Negativo; INC: Inconclusivo; MNH: Linhagem compatível com morcego não hematófago; MH: Linhagem compatível com morcego hematófago. CAM: Campinas.

Registro	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Sequenciamento	Classificação Morfométrica	OBS
214	Morcego	POS	NEG		POS	MNH	<i>Molossus molossus</i>	
302	Equino	POS	POS					
311	Bovino	POS	NEG		POS	MH		
706	Bovino	POS	POS					
742	Ovino	POS			POS	MH		
841	Bovino	POS	NEG	POS				
CAM 104	Morcego	POS	NEG					
CAM 124	Morcego	POS	NEG				<i>Artibeus lituratus</i>	
CAM 151	Morcego	POS	NEG		POS	MNH	<i>Myotis nigricans</i>	

**Tabela 4:** Total de amostras positivas para a raiva – fevereiro 2019. POS: Positivo; NEG: Negativo; INC: Inconclusivo; MR: Material Ruim; MNH: Linhagem compatível com morcego não hematófago; MH: Linhagem compatível com morcego hematófago. CAM: Campinas.

Registro	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Sequenciamento	Classificação Morfométrica	OBS
999	Bovino	POS	POS					
1044	Bovino	POS	POS					
1094	Morcego	POS		POS			<i>Tadarida brasiliensis</i>	
1162	Equino	POS			POS	MH		MR
CAM 341	Morcego	POS		POS			<i>Artibeus lituratus</i>	

**Tabela 5:** Total de amostras positivas para a raiva – março 2019. POS: Positivo; NEG: Negativo; INC: Inconclusivo; MNH: Linhagem compatível com morcego não hematófago; MH: Linhagem compatível com morcego hematófago. CAM: Campinas; RP: Ribeirão Preto.

Registro	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Sequenciamento	Classificação Morfométrica	OBS
1294	Morcego	POS					<i>Myotis albescens</i>	
1297	Morcego	POS		POS			<i>Myotis nigricans</i>	
1396	Bovino	POS	POS					
1405	Morcego	POS		POS			<i>Eptesicus furinalis</i>	
1407	Morcego	POS					<i>Myotis albescens</i>	
1428	Equino	POS						
1429	Equino	POS						
1430	Bovino	POS	POS					
1437	Bovino	POS	POS					
1512	Equino	POS	NEG					
1538	Morcego	POS					<i>Desmodus rotundus</i>	
1543	Bovino	POS	NEG					
1573	Bovino	POS	POS					
1609	Morcego	POS	NEG				<i>Myotis albescens</i>	
1626	Bovino	POS	POS					
1630	Bovino	POS	POS					
1792	Bovino	POS	POS					
1868	Bovino	POS	NEG					
1965	Bovino	POS	POS					
CAM 408	Morcego	POS		POS			<i>Eptesicus furinalis</i>	
CAM 421	Morcego	POS		POS			<i>Artibeus lituratus</i>	
CAM 439	Morcego	POS					<i>Eptesicus furinalis</i>	
CAM 463	Morcego	POS					<i>Eptesicus furinalis</i>	
CAM 486	Morcego	POS	NEG				<i>Eptesicus furinalis</i>	
CAM 516	Morcego	POS	POS				<i>Eumops glaucinus</i>	
RP 264	Morcego	POS		POS			<i>Eptesicus furinalis</i>	

**Tabela 6:** Total de amostras positivas para a raiva – abril 2019. POS: Positivo; NEG: Negativo; INC: Inconclusivo; MR: Material Ruim; IMP.: Impossibilitado; MNH: Linhagem compatível com morcego não hematófago; MH: Linhagem compatível com morcego hematófago. CAM: Campinas; RP: Ribeirão Preto.

Registro	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Sequenciamento Genético	Classificação Morfométrica	OBS
1732	Morcego	POS	POS				<i>Desmodus rotundus</i>	
1997	Bovino	POS	POS					
1998	Bovino	POS	NEG					
2001	Equino	POS	POS					
2012	Equino	POS	NEG		POS	MH		
2013	Bovino	POS	NEG					
2069	Ovino	POS	NEG					
2070	Morcego	POS	POS				<i>Desmodus rotundus</i>	
2107	Morcego	POS	NEG				<i>Eptesicus furinalis</i>	
2129	Bovino	POS	POS					
2132	Cão	POS	POS		POS	MH		
2179	Bovino	POS	POS					
2181	Bovino	POS	INC		POS	MH		
2206	Bovino	POS	POS					
2226	Equino	POS	NEG					
2260	Ovino	POS	NEG					
2261	Bovino	POS	POS					
2267	Bovino	POS	POS					
2291	Bovino	POS	NEG					
2292	Bovino	POS			POS	MH		MR
2295	Bovino	POS	POS					
2296	Bovino	POS	NEG					
2306	Bovino	POS	POS					
2320	Bovino	POS	POS					
2341	Morcego	POS	POS				<i>Eumops glaucinus</i>	
2387	Bovino	POS	NEG					
CAM 564	Morcego	POS	NEG				<i>Eptesicus furinalis</i>	
CAM 614	Morcego	POS					<i>Eptesicus furinalis</i>	
CAM 675	Morcego	POS	NEG				IMP	
RP301	Morcego	POS	POS				<i>Eptesicus furinalis</i>	
RP310	Morcego	POS	POS				<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	
RP319	Morcego	POS	POS				<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	
RP335	Morcego	POS	POS				<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	

**Tabela 7:** Total de amostras positivas para a raiva – maio 2019. POS: Positivo; NEG: Negativo; INC: Inconclusivo; MR: Material Ruim; MNH: Linhagem compatível com morcego não hematófago; MH: Linhagem compatível com morcego hematófago. CAM: Campinas; RP: Ribeirão Preto.

Registro	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Sequenciamento	Classificação Morfométrica	OBS
2388	Bovino	POS	POS		POS	MH		MR
2415	Morcego	POS	POS				<i>Artibeus lituratus</i>	
2420	Bovino	POS	POS					
2421	Bovino	POS	POS					
2422	Bovino	POS	POS					
2427	Equino	POS	POS					
2502	Morcego	POS	POS				<i>Artibeus lituratus</i>	
2511	Bovino	POS	NEG					
2512	Bovino	POS	NEG					
2514	Equino	POS	NEG					
2516	Bovino	POS	POS					
2546	Bovino	POS	POS					
2549	Bovino	POS	NEG					
2550	Bovino	POS	POS					
2551	Bovino	POS						
2561	Bovino	POS	POS					
2582	Morcego	POS	POS				<i>Artibeus lituratus</i>	
2622	Morcego	POS	POS				<i>Artibeus lituratus</i>	
CAM 687	Morcego	POS	POS				<i>Artibeus lituratus</i>	
RP 418	Morcego	POS	POS				<i>Histiotus velatus</i>	

**Tabela 8:** Total de amostras positivas para a raiva – junho 2019. POS: Positivo; NEG: Negativo; INC: Inconclusivo; MNH: Linhagem compatível com morcego não hematófago; MH: Linhagem compatível com morcego hematófago. CAM: Campinas; RP: Ribeirão Preto.

Registro	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Sequenciamento	Classificação Morfométrica	OBS
2678	Morcego	POS		POS			<i>Myotis nigricans</i>	
2682	Bovino	POS	POS					
2683	Bovino	POS	POS					
2737	Bovino	POS	POS					
2739	Ovino	POS	POS					
2766	Morcego	POS	POS				<i>Artibeus lituratus</i>	
2967	Equino	POS	NEG					
2969	Equino	POS	POS					
3082	Bovino	POS	POS					
3084	Bovino	POS	POS					
3085	Bovino	POS	POS					
3100	Bovino	POS	POS					
CAM 727	Morcego	POS		POS			<i>Artibeus lituratus</i>	
CAM 733	Morcego	POS		POS			<i>Artibeus lituratus</i>	
CAM 749	Morcego	POS	POS				<i>Artibeus lituratus</i>	
CAM 773	Morcego	POS		POS			<i>Artibeus lituratus</i>	
CAM 774	Morcego	POS		NEG	NEG		<i>Molossus molossus</i>	
CAM 778	Morcego	POS		POS			<i>Artibeus lituratus</i>	
CAM 860	Morcego	POS	POS		POS	MH	<i>Artibeus lituratus</i>	
RP 477	Morcego	POS		POS			<i>Artibeus lituratus</i>	

**Tabela 9:** Total de amostras positivas para a raiva – julho 2019. POS: Positivo; NEG: Negativo; INC: Inconclusivo; MNH: Linhagem compatível com morcego não hematófago; MH: Linhagem compatível com morcego hematófago. CAM: Campinas; RP: Ribeirão Preto.

Registro	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Sequenciamento	Classificação Morfométrica	OBS
3537	Equino	POS	NEG					
3525	Bovino	POS	NEG					
3609	Bovino	POS	POS					
3623	Bovino	POS	POS					
3624	Ovino	POS	POS					
3648	Morcego	POS	POS				<i>Eptesicus furinalis</i>	
3688	Bovino	POS	POS					
3699	Morcego	POS	POS				<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	
RP 636	Morcego	POS	NEG				<i>Artibeus lituratus</i>	
RP 668	Morcego	POS	POS				<i>Eptesicus furinalis</i>	
RP 700	Morcego	POS	POS				<i>Histiotus velatus</i>	
CAM 918	Morcego	POS	POS				<i>Myotis albescens</i>	
CAM 940	Morcego	POS	POS				<i>Artibeus lituratus</i>	
CAM 941	Morcego	POS	POS				<i>Artibeus lituratus</i>	
CAM 1008	Morcego	POS	POS				<i>Myotis albescens</i>	
CAM 1011	Morcego	POS	POS				<i>Eptesicus furinalis</i>	
CAM 1026	Morcego	POS	POS				<i>Eptesicus furinalis</i>	

**Tabela 10:** Total de amostras positivas para a raiva – agosto 2019. POS: Positivo; NEG: Negativo; INC: Inconclusivo; MR: Material Ruim; MNH: Linhagem compatível com morcego não hematófago; MH: Linhagem compatível com morcego hematófago. RP: Ribeirão Preto.

Registro	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Sequenciamento	Classificação Morfométrica	OBS
3266	Morcego	POS	POS				<i>Molossus molossus</i>	
3309	Bovino	POS	POS					
3311	Morcego	POS	POS				<i>Desmodus rotundus</i>	
3315	Bovino	POS			POS	MH		MR
3317	Morcego	POS	NEG				<i>Molossus rufus</i>	
3318	Bovino	POS	POS					
3390	Bovino	POS	POS					
3471	Gato	POS	POS		POS	MH		
3476	Bovino	POS			POS	MH		MR
3477	Bovino	POS	NEG					
RP 569	Morcego	POS	POS				<i>Artibeus lituratus</i>	
RP 587	Morcego	POS	POS				<i>Artibeus lituratus</i>	

**Tabela 11:** Total de amostras positivas para a raiva – setembro 2019. POS: Positivo; NEG: Negativo; INC: Inconclusivo; MR: Material Ruim; MNH: Linhagem compatível com morcego não hematófago; MH: Linhagem compatível com morcego hematófago. RP: Ribeirão Preto.

Registro	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Sequenciamento	Classificação Morfométrica	OBS
4090	Bovino	POS	POS					
4110	Bovino	POS	POS					
4047	Bovino	POS	POS					
4072	Ovino	POS	POS					
RP 765	Morcego	POS	POS				<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	
4011	Equino	POS	POS		POS			
3973	Equino	POS	POS					
3953	Morcego	POS	POS				<i>Artibeus lituratus</i>	
3911	Bovino	POS	POS					
3913	Bovino	POS			POS			MR
3834	Bovino	POS	INC		POS			
3824	Morcego	POS	POS				<i>Artibeus lituratus</i>	
3804	Bovino	POS						
3811	Morcego	POS	POS				<i>Artibeus lituratus</i>	

**Tabela 12:** Total de amostras positivas para a raiva – outubro 2019. POS: Positivo; NEG: Negativo; INC: Inconclusivo; MNH: Linhagem compatível com morcego não hematófago; MH: Linhagem compatível com morcego hematófago. RP: Ribeirão Preto.

Registro	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Sequenciamento	Classificação Morfométrica	OBS
3783	Equino	POS	POS					
4072	Ovino	POS	POS					
4047	Bovino	POS	POS					
4110	Bovino	POS	POS					
4090	Bovino	POS	POS					
RP765	Morcego	POS	POS				<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	

**Tabela 13:** Total de amostras positivas para a raiva – novembro 2019. POS: Positivo; NEG: Negativo; INC: Inconclusivo; MNH: Linhagem compatível com morcego não hematófago; MH: Linhagem compatível com morcego hematófago. RP: Ribeirão Preto.

Registro	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Sequenciamento	Classificação Morfométrica	OBS
4456	Equino	POS	POS					
4491	Gato	POS	NEG		POS	MH		
4492	Cão	POS	POS		POS	MH		
4458	Morcego	POS	POS				<i>Lasiurus blossevilli</i>	
4345	Bovino	POS	POS					
4315	Ovino	POS	POS					
4328	Morcego	POS	NEG				<i>Myotis nigricans</i>	
4229	Bovino	POS	POS					
4268	Bovino	POS	POS					
RP887	Morcego	POS	NEG				<i>Myotis albescens</i>	

**Tabela 14:** Total de amostras positivas para a raiva – dezembro 2019. POS: Positivo; NEG: Negativo; INC: Inconclusivo; MNH: Linhagem compatível com morcego não hematófago; MH: Linhagem compatível com morcego hematófago. CAM: Campinas; RP: Ribeirão Preto.

Registro	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Sequenciamento	Classificação Morfométrica	OBS
4704	Morcego	POS	POS				Desmodus rotundus	
4729	Bovino	POS	POS					
4730	Bovino	POS	NEG					
4732	Morcego	POS	NEG				Desmodus rotundus	
4828	Morcego	POS					Myotis nigricans	
4999	Bovino	POS						
5206	Equino	POS	NEG					
CAM 1371	Morcego	POS	POS				Myotis nigricans	
CAM 1375	Morcego	POS					Artibeus lituratus	
CAM 1436	Morcego	POS					Myotis albescens	
RP 1091	Morcego	POS					<i>Eptesicus furinalis</i>	

Ao analisar os resultados da IFD negativos, houve concordância de 99.9% (6913/6923) com as demais técnicas aplicadas. As 10 amostras com resultados divergentes foram analisadas por técnicas complementares (IVCC, IVC e RT-PCR) com resultados positivos para a raiva. Este dado reflete 0.14% de resultado falso-negativo por IFD. As amostras provenientes de equinos corresponderam à 50% (5/10) destes falsos-negativos (Tabela 15). No período estudado foram encaminhados 60 equinos negativos na IFD para as técnicas moleculares (Tabela16).

Cinco amostras resultaram inconclusivas por IFD (0.07%), sendo que em uma amostra de bovino o resultado foi positivo por RT-PCR e nas demais amostras o resultado foi negativo nas demais técnicas aplicadas, concordando com os resultados da IFD (Tabela 17). O SNC do bovino supracitado estava degradado, o que pode ter limitado a eficácia da IFD neste caso.

Todas as amostras classificadas como MR (N=78) foram encaminhadas para RT-PCR, sendo que duas não foram realizadas; uma foi inconclusiva na IFD e Positiva por RT-PCR, e em 75 o resultado foi concordante com a IFD, correspondendo a 98.7% do total analisado (75/76) (Tabela 18).

A sensibilidade e especificidade da IFD foram avaliadas em relação aos resultados obtidos dentre todas as demais técnicas complementares conjuntamente.

A sensibilidade foi de 94.3% e a especificidade de 99.9%, com acurácia de 99.8% (Tabela19).

**Tabela 15:** Amostras com resultados Negativos por IFD e positivo nas demais técnicas. POS: Positivo; NEG: Negativo; INC: Inconclusivo; MNH: Linhagem compatível com morcego não hematófago; MH: Linhagem compatível com morcego hematófago. CAM: Campinas.

Registro	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Sequenciamento	Classificação Morfométrica	OBS
1427	Equino	NEG			POS	MH		
1536	Morcego	NEG	POS				<i>Desmodus rotundus</i>	
1607	Equino	NEG			POS	MH		
1795	Equino	NEG	NEG		POS	MH		
2096	Equino	NEG	NEG		POS	MH		
2515	Equino	NEG	NEG		POS	MH		
2824	Bovino	NEG	NEG		POS	MH		
CAM 89	Morcego	NEG	POS		POS	MH		
CAM 807	Morcego	NEG	POS		POS	MH	<i>Artibeus lituratus</i>	
CAM 219	Morcego	NEG	POS	POS				

**Tabela 16:** Amostras de equinos Negativos na Imunofluorescência Direta e encaminhados para RT-PCR. NEG: Negativo; POS: Positivo; CAM: Campinas.

Amostra	Registro	Resultado IFD	Resultado RT-PCR
01	239	N	N
02	329	N	N
03	434	N	N
04	435	N	N
05	449	N	N
06	452	N	N
07	454	N	N
08	998	N	N
09	1375	N	N
10	1427	N	POS
11	1460	N	N
12	1607	N	POS
13	1608	N	N
14	1739	N	N
15	1763	N	N
16	1767	N	N
17	1771	N	N
18	1795	N	POS
19	2096	N	POS
20	2123	N	N
21	2185	N	N
22	2192	N	N
23	2233	N	N
24	2234	N	N
25	2235	N	N
26	2237	N	N
27	2270	N	N
28	2497	N	N
29	2515	N	POS
30	2548	N	N
31	2646	N	N
32	2667	N	N
33	2735	N	N
34	2747	N	N
35	2748	N	N
36	2827	N	N

37	2829	N	N
38	2907	N	N
39	3019	N	N
40	3029	N	N
41	3150	N	N
42	3286	N	N
43	3312	N	N
44	3417	N	N
45	3478	N	N
46	3481	N	N
47	3517	N	N
48	3710	N	N
49	3782	N	N
50	3912	N	N
51	4039	N	N
52	4129	N	N
53	4299	N	N
54	4314	N	N
55	4916	N	N
56	4929	N	N
57	4970	N	N
58	5017	N	N
59	5125	N	N
60	CAM 1278	N	N

**Tabela 17:** Amostras com resultado inconclusivo por IFD. POS: Positivo; NEG: Negativo; INC: Inconclusivo; MNH: Linhagem compatível com morcego não hematófago; MH: Linhagem compatível com morcego hematófago. CAM: Campinas.

Registro	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Sequenciamento	Classificação Morfométrica	OBS
710	Morcego	INC	NEG		NEG			
2294	Bovino	INC			POS	MH		MR
2645	Bovino	INC		NEG	NEG			
CAM 728	Morcego	INC		NEG	NEG			
CAM 985	Morcego	INC	NEG		NEG			

**Tabela 18:** Relação de amostras MR encaminhadas para diagnóstico molecular. N: Negativo; P: Positivo; CAM: Campinas; RP: Ribeirão Preto; PNH: Primata não-humano.

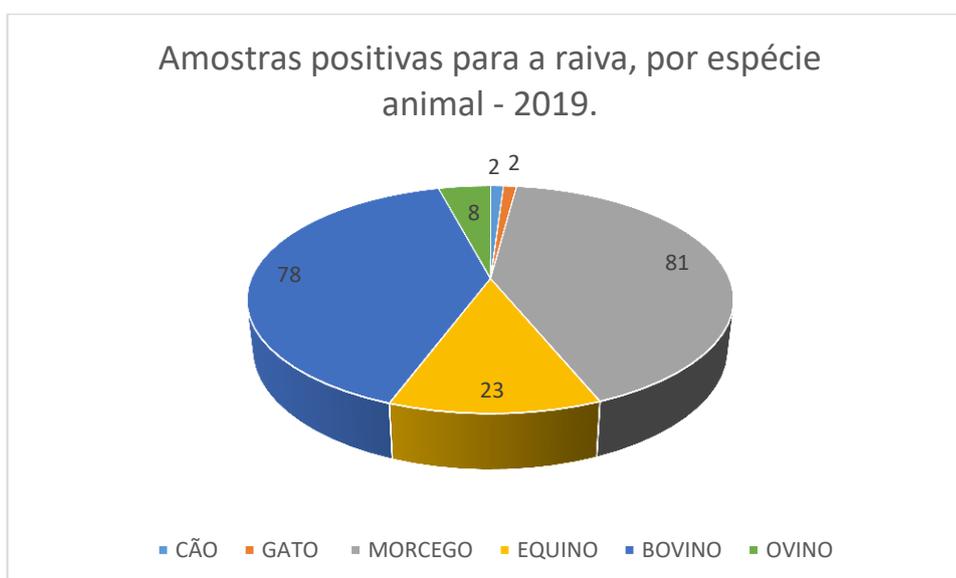
Amostra	Registro	Espécie	Resultado IFD	Resultado RT-PCR
01	110	PNH	N	N
02	184	Morcego	N	N
03	185	Morcego	N	N
04	551	Cão	N	N
05	708	Gato	N	N
06	709	Cão	N	N
07	728	Morcego	N	N
08	862	Cão	N	N
09	1363	PNH	N	N
10	1364	PNH	N	N
11	1390	Cão	N	N
12	1488	Gato	N	N
13	1535	Bovino	N	N
14	1541	Cão	N	N
15	1618	Cão	N	N
16	1720	Gato	N	N
17	1951	Veado	N	N
18	2036	Gato	N	N
19	2085	Cão	N	N
20	2094	Gato	N	N
21	2185	Equino	N	N
22	2239	Cão	N	N
23	2263	Gato	N	N
24	2292	Bovino	P	P
25	2294	Bovino	INC	P
26	2527	Ovino	N	N
27	2590	Cão	N	N
28	2672	PNH	N	N
29	2742	Cão	N	N
30	3041	Cão	N	N
31	3046	Cão	N	N
32	3048	Cão	N	N
33	3198	Cão	N	N
34	3315	Bovino	P	P
35	3351	Cão	N	N
36	3454	Gato	N	N
37	3476	Bovino	P	P
38	3562	Bovino	N	N
39	3571	Gato	N	N
40	3619	Cão	N	

41	3651	Cão	N	N
42	3682	Gato	N	N
43	3683	Gato	N	N
44	3790	Gato	N	N
45	3823	Gato	N	N
46	3832	Equino	N	
47	3860	Gato	N	N
48	3902	Cão	N	N
49	3939	Silvestre	N	N
50	3998	Gato	N	N
51	4228	Gato	N	N
52	4237	Cão	N	N
53	4358	Cão	N	N
54	4525	Morcego	N	N
55	4925	Marsupial	N	N
56	4963	Cão	N	N
57	5209	Cão	N	N
58	5211	Cão	N	N
59	5260	Cão	N	N
60	RP 67	Cão	N	N
61	RP 69	Cão	N	N
62	RP 132	Cão	N	N
63	RP 136	Gato	N	N
64	RP 186	Cão	N	N
65	RP 297	Gato	N	N
66	RP 521	Gato	N	N
67	RP 730	Cão	N	N
68	RP 960	Gato	N	N
69	RP 987	Gato	N	N
70	CAM 24	Morcego	N	N
71	CAM 282	Gato	N	N
72	CAM 297	Morcego	N	N
73	CAM 892	Morcego	N	N
74	CAM 1149	Morcego	N	N
75	CAM 1337	Cão	N	N
76	CAM 1342	Gato	N	N
77	CAM 1360	PNH	N	N
78	CAM 1582	PNH	N	N

---

**Tabela 19:** Avaliação da sensibilidade e especificidade da técnica de IFD no diagnóstico da raiva do IP – 2019.

IFD	Com Raiva	Sem Raiva	Indefinido	Total
Positivo	183	0	0	183
Negativo	10	6913	0	6923
Inconclusivo	01	04	0	05
Total	194	6917	0	7111



**Gráfico 3:** Total de positivos na IFD por espécie animal.

## 5. DISCUSSÃO

A raiva é a única zoonose cujo tratamento profilático dos humanos depende essencialmente do diagnóstico laboratorial das amostras dos animais agressores (OPAS, 2001), assim, o mesmo deve ser rápido e preciso. As técnicas aplicadas devem ter alta sensibilidade e especificidade, além disso, devem estar associadas à outras metodologias complementares (KOTAIT *et al.*, 2009).

O Laboratório de Diagnóstico da Raiva do IP é responsável em realizar o diagnóstico de aproximadamente 65% do total de animais suspeitos do Estado de São Paulo sendo a técnica de imunofluorescência direta (IFD) a metodologia básica para este fim (MARTINS, 2015). Segundo Silva; Silva e Guimarães (1973), a IFD reúne indiscutivelmente as vantagens de rapidez e especificidade, quando se tem em foco o diagnóstico laboratorial. Entretanto, a viabilidade das amostras submetidas é fundamental ao se tratar de IFD. Amostras degradadas tendem a apresentar baixa sensibilidade analítica devido à possível deterioração do antígeno viral, porém, podem ser examinadas por metodologias moleculares. Na presente análise realizada no IP durante o ano de 2019, foi observado que a IFD apresentou resultados confiáveis em 99.94% das amostras com condições adequadas (*in natura*), corroborando com os resultados anteriormente obtidos, em que um percentual de 95-99% foi observado, em que aproximadamente 97% das amostras apresentaram condições adequadas para avaliação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Em nosso estudo, do total de 78 amostras consideradas inadequadas devido ao avançado estágio de degradação, uma foi inconclusiva na IFD e posteriormente diagnosticada positiva por metodologia molecular. Soares e col. (2002) já demonstraram a eficácia na utilização da técnica de RT-PCR complementarmente à IFD com resultado negativo, bem como nos casos de urgência no diagnóstico, quando as amostras foram estocadas inadequadamente, gerando autólise. Estudos de David *et al.* (2002) relataram que em amostras degradadas até 36 dias à temperatura de 37°C, a sensibilidade de detecção da RT-PCR foi maior quando comparada às técnicas de imunofluorescência direta e ao isolamento viral em camundongos. Vários outros autores compararam os resultados da RT-PCR com a

IFD em amostras em decomposição, avaliando a queda de sensibilidade relacionada com o tempo de deterioração do tecido cerebral (KAMOLVARIN *et al.*, 1993; HEATON *et al.*, 1997 e WHITBY *et al.*, 1997).

A fixação do tecido é determinante para que os campos sejam visualizados ao microscópio. Nossos resultados demonstraram não haver diferença notável na qualidade do tecido avaliado de lâminas fixadas à -20°C ou à temperatura ambiente. Em relação ao tempo, o mesmo foi prolongado para 1h, seguindo protocolo estabelecido (RUPPRECHT *et al.*, 2018). Diante da alta demanda diagnóstica do IP, em que são realizadas reações de IFD diariamente, a qualidade das lâminas utilizadas como controle positivo e negativo das reações é fundamental, assim, recomenda-se que os controles sejam mantidos à -20°C por até 15 dias, especialmente os positivos, diferente do período de 30 dias estabelecido pelo CDC (RUPPRECHT *et al.*, 2018). A positividade dos controles é prejudicada com o passar do tempo, o que pode ser devido à degradação do *imprint* ocasionado por mudanças de temperatura, visto que o *freezer* é manipulado diariamente em diferentes momentos.

É recomendado que na técnica de IFD o conjugado (anticorpo antirrábico marcado com ITCF) seja préadsorvido em suspensão de tecido nervoso de camundongos quando produzido a partir de vírus multiplicado em cérebro de camundongos (LARGHI, 1971 e DEAN *et al.*, 1996) Entretanto, ao se utilizar cultivo celular para a produção de um conjugado, a utilização de suspensão produzida em animais torna-se desnecessária, pois o objetivo minimizar possíveis reações inespecíficas decorrentes da presença de tecido nervoso no imunógeno utilizado na imunização dos animais na produção do conjugado (CAPORALE, 2010). Na rotina laboratorial do IP é utilizado o conjugado monoclonal MILLIPORE MAB 0051, o qual é produzido a partir de vírus produzido em cultura celular.

Na avaliação da utilização do CVS produzido *in vivo* e *in vitro*, os resultados demonstraram concordância entre as lâminas testadas. Houve neutralização do conjugado diluído com suspensão de SNC de camundongos infectados bem como do diluente preparado a partir das culturas de células BHK-21 infectadas. CAPORALE (2010) já demonstrou a viabilidade de diluição do conjugado em suspensões virais produzidas em linhagens celulares (BHK-21 e N2A), constatando ainda uma vantagem na utilização de vírus produzido em BHK21, pois há a

necessidade de aumento da concentração dos diluentes produzidos *in vitro* durante a produção das suspensões, o que possibilita a realização de um maior número de técnicas de IFD, visto que o volume de conjugado diluído é maior.

O período de pré-adsorção do conjugado com as suspensões de CVS seguiu o protocolo utilizado na rotina laboratorial, sendo de aproximadamente 15 minutos. Estudos anteriores demonstraram um aumento progressivo da inibição de fluorescência à medida que se aumentasse os períodos de pré-adsorção (ROEHE *et al.*, 2002). Como nossa análise prática foi prospectiva, não foi possível a realização de diversos períodos devido à incerteza de se ter amostras positivas para esta avaliação. Contudo, rotineiramente não são observados ruídos recorrentes à eventual falta de inibição de fluorescência durante as avaliações de lâminas.

Em relação à intensidade de fluorescência nos fragmentos de SNC de herbívoros positivos avaliados no período, observou-se que fragmentos de cerebelo e tronco encefálico apresentaram um aumento na intensidade de células infectadas, com numerosos corpúsculos de inclusão de forma dispersa, em relação ao hipocampo e córtex. Diversos estudos demonstram que o tronco encefálico, especialmente regiões de medula, tálamo e ponte, são mais indicados para técnicas laboratoriais para diagnóstico da raiva (BASSUINO *et al.*, 2016). Além disto, a análise dos dois hemisférios cerebrais é fundamental, especialmente em animais de grande porte, devido à possibilidade de disseminação unilateral do vírus (RUPPRECHT *et al.*, 2018). Estes dados reforçam a necessidade de envio de todos os fragmentos de SNC, especialmente no caso de herbívoros, para que não ocorram eventualmente resultados falso-negativos. Costa e col. (2000) já afirmaram a necessidade de enviar o encéfalo inteiro ou fragmentos do tecido cerebral de ambos os hemisférios (córtex, cerebelo e hipocampo).

O resultado da IFD é determinante para influenciar a conduta no tratamento de indivíduos agredidos, além de ações para a vigilância. Deste modo, amostras com resultados negativos devem ser submetidas às metodologias complementares para que se confirme o diagnóstico. Amostras com resultados positivos na IFD devem ser imediatamente notificadas, sendo este resultado conclusivo.

Nossos resultados demonstraram concordância de 99.9% dos resultados negativos na IFD com outras metodologias complementares, refletindo uma alta especificidade da técnica. Do total de 6923 amostras negativas, 10 apresentaram

resultados discordantes com as demais metodologias, sendo 05 de equinos. A raiva em equinos é considerada de difícil diagnóstico clínico, especialmente por apresentar uma grande variação de sinais (VASCONCELLOS, 2003). Isso se reflete no diagnóstico da raiva nestas espécies, em que resultados falsos negativos na IFD são rotineiramente observados. Observamos nesta análise que 05 de 60 amostras de SNC de equinos negativos na IFD resultaram positivos nas técnicas moleculares. Estes resultados corroboram dados anteriormente apresentados de que, a técnica de IFD em amostras de equinos apresenta menor sensibilidade e especificidade, quando comparada às demais espécies. Peixoto et al. (2000) demonstraram que, no diagnóstico da raiva em amostras de SNC de equinos, a sensibilidade da IFD em relação ao IVC é de 76,6% e que o percentual de falsos negativos na IFD poderia chegar a 20%. Carrieri et al. (2006), ao analisarem amostras de origem equina, evidenciaram que além da sensibilidade entre essas duas técnicas depender do fragmento utilizado, ocorriam baixas concentrações virais no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo, sendo a medula e o tronco encefálico as seções mais recomendadas para o diagnóstico laboratorial.

Nossos resultados corroboram com a literatura de que a técnica de IFD apresenta alta sensibilidade e especificidade, sendo fundamental para a tomada de condutas de vigilância ativa da doença. A IFD, assim como qualquer metodologia diagnóstica, não apresenta 100% de acurácia, porém, critérios bem estabelecidos para sua execução são fundamentais para que os resultados sejam confiáveis e seguros.

## 6. CONCLUSÕES

Os procedimentos laboratoriais executados na rotina do Diagnóstico Laboratorial da Raiva no Instituto Pasteur atendem aos requisitos em relação à eficácia da técnica, entretanto, faz-se necessária a adequação dos registros de temporalidade das alíquotas de reagentes, insumos e controles utilizados;

O processamento de amostras recebidas para diagnóstico por IFD podem ser melhorados, especialmente em relação ao armazenamento, e em relação à fixação dos *imprints* em acetona P.A. gelada. Observamos que a fixação em temperatura ambiente demonstrou similaridade quando comparadas às lâminas fixadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , utilizando os mesmos fragmentos SNC das mesmas amostras. A disposição dos *coplins* fora do *freezer* evita o derramamento de acetona no interior do equipamento.

A utilização de conjugado monoclonal ou policlonal nos testes de IFD deve ser criteriosamente avaliada, pois este insumo é fundamental para a realização destas reações.

Para a diluição do conjugado na IFD, os resultados obtidos neste estudo corroboram com estudos já realizados, e permitem a substituição do diluente produzido *in vivo* pelo produzido *in vitro*, representando uma inovação tecnológica para a não utilização de animais como produto desse diagnóstico, o que contribui efetivamente com a ética animal.

Fragmentos de cerebelo em SNC de herbívoros avaliados no período apresentaram um ligeiro aumento de células infectas em relação a córtex e hipocampo, sugestivo da disseminação unilateral do vírus principalmente em grandes animais, reforçando a necessidade de encaminhamento de amostras íntegras para o laboratório de diagnóstico.

Amostras com resultados negativos na IFD são confiáveis, desde que a sensibilidade e especificidade da técnica estejam sejam altas. Nesta avaliação, as dez amostras que apresentaram resultado falso negativo na IFD eram provenientes de morcegos, bovino e equinos. Conforme norma estabelecida, resultados negativos na IFD em amostras desta natureza devem ser liberados após a conclusão de uma técnica diagnóstica complementar.

Amostras com resultados inconclusivos na IFD devem ser imediatamente encaminhados para execução de RT-PCR, especialmente a amostra originalmente recebida para diagnóstico. A aplicação de técnicas moleculares é ideal em casos complicados da IFD, podendo ser decorrente de baixa carga viral, ou degradação da amostra.

O encaminhamento de amostras de equinos negativos na IFD para as técnicas moleculares é essencial, visto que a sensibilidade da técnica nesta espécie é reduzida, conforme estudos anteriores. Observamos que 8.4% das amostras encaminhadas resultaram positivas por RT-PCR/sequenciamento genético.

Os resultados da IFD negativa com as demais técnicas complementares tiveram concordância de 99.9%, o que demonstra uma alta especificidade da IFD executada no IP no ano de 2019.

A sensibilidade da IFD durante o ano de 2019 no IP foi de 94.3%. Dentre o total de falsos negativos na IFD, metade correspondeu às amostras provenientes de equinos e o restante foi na grande maioria morcegos (04/10) e bovino (01/10).

## 7. REFERÊNCIAS

Acha, PN and Szyfres B. 2003: Rabia. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3rd ed. Organizacion Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organizacion Mundial de la Salud, Washington, D.C.

Aoki, V, Sousa, JX, Fukumori, LMI, Perigo, AM, Freitas, LF, Oliveira, ZNP. Imunofluorescência direta e indireta. *An Bras Dermatol* 2010 aug;85(4):490-500.

Aoki, V. Exames por imunofluorescência, immunoblotting e imunoprecipitação. In: RIVITTI, EA. Manual de dermatologia clínica de Sampaio e Rivitti. São Paulo: Artes Médicas, 2014. p. 33-40.

Bassuino DM; Konradt G; Cruz RAS; Silva GS; Gomes DC; Pavarini SP et al. Characterization of spinal cord lesions in cattle and horses with rabies: the importance of correct sampling to the diagnosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*; 2016 jun;28(4):455-460.

Beutner, EH. The development of immunofluorescence and the immunopathology of the skin. *Int J Dermatol*. 2003 feb;42(2):99-109.

Castilho, JG; Achkar, S; Oliveira, RN; Mori, E; Carnieli, Jr.P; Macedo, CI. Analysis of rabies diagnosis in dogs and cats in the state of São Paulo, Brazil. *Archives of Virology*. 2018; 163 (9): 2369-2376.

Caporale, GMM. Purificação de Subunidades do vírus da raiva por meio de cromatografia. Tese [Doutorado - Curso de Biotecnologia] - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Carrieri ML, Peixoto ZMP, Paciencia MLB, Kotait I, Germano PML. Laboratory diagnosis of equine rabies and its implications for human postexposure prophylaxis. *J Virol Meth*. 2006; 138:1-9.

Centers for Disease Control and prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5. ed. Atlanta, 2009.

Coleman PG, Fèvre EM, Cleaveland S. Estimating the Public Health Impact of Rabies. *Emerg Inf Dis*, 2004; 10(01):140-143.

Costa, WA *et al.* Manual técnico do Instituto Pasteur. 2. ed. São Paulo: Instituto Pasteur, 2000. 43 p.

Coons, AH; Kaplan, MH. Localization of Antigen in Tissue Cells: Improvements in a Method for the Detection of Antigen by Means of Fluorescent Antibody. *J Exp Med* 1949 aug; 1(91):1-13.

David D; Yakobsona B; Rotenberga D; Dveresa N; Davidsonb I; Stram Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. *Veterinary Microbiology* 2002 mar; 87(2):111-118.

Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P. Fluorescent antibody test. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. *Laboratory techniques in rabies*, 4ed Geneva: World Health Organization; 1996. p. 88-95.

Garcia JG; Achkar SM; Rodrigues AC; Freitas FC; Scheffer KC; Caparole GM *et al.* Replacement method for the production of inputs used in the direct immunofluorescence technique: in vivo for in vitro. *Rabies in the Americas International Meeting*; 2013 oct 23-28. Belém, 2016.

Goldwasser, RA; Kissling, RE. Fluorescent Antibody Staining of Street and Fixed Rabies Virus Antigens. *Exp Biol Med*. 1958 mar; 2(98):219-223.

Heaton PR; Johnstone P; Mcelhinney LM; Cowley R; O'sullivan E; Whitby JE. Heminested PCR Assay for Detection of Six Genotypes of Rabies and Rabies-Related Viruses. *Journal of Clinical Microbiology* 1997 nov;35(11):2762-2766.

ICTV Virus Taxonomy – International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). <http://www.ictvonline.org.br>. Acesso em 20 abr 2019.

Kamolvarin N; Tirawatnpong T; Rattanasiwamoke R; Tirawatnpong S; Panpanich T; Hemachudha T. Diagnosis of Rabies by Polymerase Chain Reaction with Nested Primers. *J Epidemiol* 1993 Jan;167(1):207-210.

Kotait, I; Carrieri, ML; Takaoka, NY. Manual Técnico do Instituto Pasteur. Vol. 8. Raiva: aspectos gerais e clínica. São Paulo: Instituto Pasteur, 2009. 49p.il. Disponível no site [www.saude.sp.gov.br/instituto-pasteur/](http://www.saude.sp.gov.br/instituto-pasteur/)

Larghi OP. Prueba de anticorpos fluorescentes para rabia. Nota Técnica no8. Centro Panamericano de Zoonosis. 1971 Buenos Aires, 23 p.

Martins CM. O Laboratório de Diagnóstico da Raiva do IP é responsável em realizar o diagnóstico de aproximadamente 65% do total de animais suspeitos. [Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada] – USP; 2015.

Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da raiva. Brasília: MS, 2008.

Ministério da Saúde. Guia de vigilância Epidemiológica. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

Ministério da Saúde. Norma Técnica de Tratamento Profilático Anti-Rábico Humano, 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

Murphy, FA. 1985. The pathogenesis of rabies virus infection. *In* World's debt to Pasteur, H. Koprowski and S. A. Plotkin (eds.). Alan R. Liss, New York, New York, pp. 342.

Organização Pan-Americana da Saúde. Boletín de Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas. Rio de Janeiro: Organização Pan-Americana da Saúde; 2001.

Peixoto ZMP; Cunha SEM; Sacramento DRV; Souza MCAM; Kroeff SS; Kotait I. et al. Rabies Laboratory Diagnosis: Peculiar Features of Samples From Equine Origin. *Brazilian Journal of Microbiology* 2000 apr;31:71-75.

Perrin P, Techniques for the preparation of rabies conjugates *In*: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies, 4ed Geneva: World Health Organization; 1996. p. 433-442.

Roehe PM; Schaefer R; Pereira AS. Otimização da imunofluorescência para diagnóstico da raiva. *Acta Scientiae Veterinariae* 2002 apr; 30(1):53-57.

Rudd RJ, Smith JS, Yagger PA, Orciari LA, Trimarchi CV. A need for standardized rabies-virus diagnostic procedures: Effect of cover-glass mountant on the reliability of antigen detection by the fluorescent antibody test. *Virus Res.* 2005 apr; 1(11):83-88.

Rupprecht, CE; Fooks, AR.; Abela-ridder, B. Laboratory techniques in rabies. 5 ed. Geneva: World Health Organization, 2018. p. 108-129.

Silva RA; Silva NM; Guimarães RS. A Utilização do Método de Imunofluorescência Comparativamente com os Métodos Histoquímico e Biológico no Diagnóstico da Raiva. Pesq. Agropec. Bras. 1973 8;1-4.

Soares RM; Bernardi F; Sakamoto SM; Heinemann MB; Cortez A; Alves LM et al. A Heminested Polymerase Chain Reaction for the Detection of Brazilian Rabies Isolates from Vampire Bats and Herbivores. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002 jan;97(1):109-111.

Teixeira, TF; Batista, HBCR; Schmidt, E. 2005. Estudo antigênico de amostras do vírus da raiva isoladas no Rio Grande do Sul, Brasil. Acta Scientiae Veterinariae;3(33):271-275.

Vasconcellos, MEP. Caracterização biológica, genética e sorológica de uma amostra de vírus da raiva isolada de equino de uma região próxima de São Paulo, Sudeste do Brasil [Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada a Zoonoses] – Universidade de São Paulo; 2003.

Vieira, A; Kotait, I; Hardt, L; Kawai, JGC; Takaoka, N. Instituto Pasteur – Os desafios do controle da raiva e outras encefalites. BEPA 2014 jan;121(11):11-20.

World Health Organization. Laboratory biosafety manual. 3. ed. Geneva: Who, 2004. 215 p.

Whitby JE, Johnstone P, Sillero-Zubiri C. Rabies Virus in the Decomposed Brain of an Ethiopian Wolf Detected by Nested Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. Journal of worldwide diseases 1997 oct;33(4):912-915.