

ADRIANA CANDIDO RODRIGUES NASRAUI

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE
IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA, ISOLAMENTO
VIRAL EM CAMUNDONGOS E ISOLAMENTO VIRAL
EM CULTIVO CELULAR UTILIZADAS NO
DIAGNÓSTICO DA RAIVA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Coordenadoria de
Controle de Doenças da Secretaria
de Estado da Saúde de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Profa. Dra. Juliana Galera Castilho Kawai

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Nasraui, Adriana Candido Rodrigues

Estudo comparativo entre as técnicas de imunofluorescência direta, isolamento viral em camundongos e isolamento viral em cultivo celular utilizadas no diagnóstico da raiva/ Adriana Candido Rodrigues Nasraui. -2020.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Juliana Galera Castilho Kawai.

1. Raiva/diagnóstico.
2. Imunofluorescência/método.
3. Isolamento.
4. Técnicas de laboratório clínico.

SES/CCD/CD-410/2020

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

**Trabalho realizado no Instituto
Pasteur de São Paulo/SP da
Coordenadoria de Controle de
Doenças - Secretaria de Estado
da Saúde de São Paulo.**

Dedico este trabalho a minha mãe Sandra, que sempre foi meu porto seguro e sempre esteve comigo nos meus melhores e piores momentos; a minha irmã Andrea que sempre embarcou comigo em minhas viagens, fossem imaginárias ou não; e ao meu maior tesouro, meu filho Daniel que sempre me deu muito orgulho e sempre me incentivou nesta jornada.

Agradecimentos

Agradeço à Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Agradeço a minha orientadora, a professora doutora Juliana Galera Castilho Kawai, pela confiança e pelos ensinamentos.

Agradeço a professora Débora Nunes de Souza, pelo convívio, colaboração, amizade e carinho.

Agradeço a Direção do Instituto Pasteur, por proporcionar esta oportunidade dando condições necessárias para o desenvolvimento desta Dissertação.

Agradeço a professora doutora Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista, que sempre acreditou e me incentivou nesta jornada.

Aos colegas Pesquisadores do Instituto Pasteur, pela participação no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos meus familiares, Sandra Maria Candido Rodrigues, Andréa Candido Rodrigues, Daniel Rodrigues Nasraui e Tadeo José Nasraui, pelo incentivo e apoio permanente.

Aos meus colegas do Instituto Pasteur, Rene Cunha Neto e Karina Ribeiro da Silva, pelo apoio e colaboração.

A todos os funcionários do Instituto Pasteur, que de forma direta ou indireta me auxiliaram.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação, que colaboraram para minha formação científica.

Agradeço a professora Rosa Maria Nascimento Marcusso pela colaboração e participação no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos, pois cada um contribuiu de uma forma particular, até mesmo sem saber.

Rodrigues, A. C. **Estudo comparativo entre as técnicas de imunofluorescência direta, isolamento viral em camundongos e isolamento viral em cultivo celular utilizadas no diagnóstico da Raiva.** 2020. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Pós-Graduação da CCD, Secretaria de Estado da Saúde - São Paulo/SP, 2020.

RESUMO

O diagnóstico laboratorial da Raiva é de fundamental importância para avaliação dos casos suspeitos de infecção pelo vírus da raiva (RABV) e as técnicas utilizadas devem apresentar alta sensibilidade e especificidade, bem como rapidez na obtenção dos resultados. No diagnóstico da Raiva é recomendado a confirmação do resultado da Imunofluorescência direta (IFD) através do isolamento viral (IV). Como o isolamento viral em camundongos (IVC) está sendo substituído pelo isolamento viral em cultura de células (IVCC) por questões éticas, estudos são necessários para avaliação do emprego da técnica de IVCC na rotina de diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur (IP). O objetivo desse estudo foi avaliar o fluxo do diagnóstico da Raiva do Laboratório de Virologia do IP, por meio de análise estatística pelo índice de concordância, sensibilidade, especificidade e acurácia nos testes de IFD, IVCC e IVC. Para essa avaliação foram utilizados resultados obtidos na rotina de diagnóstico do Laboratório de Virologia do IP no período de 2008 a 2016 em 6.514 amostras de Sistema Nervoso Central (SNC) de diferentes espécies animais. A IFD foi a técnica que apresentou melhores resultados de sensibilidade (93,58%), especificidade (95,90%) e acurácia (95,67%). Para o IVCC os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia foram inferiores a IFD sendo 70,42%, 86,16% e 84,62%, respectivamente. A concordância entre o IVCC e IFD foi moderada com índice de *kappa* $k= 0,341$. A sensibilidade, especificidade e acurácia do IVC foi de 89,58%, 100% e 98,97%, respectivamente. A concordância entre o IVC e IFD, teve um valor de *k* substancial (0,720). A IFD, considerada padrão ouro mostrou-se efetiva em todos os animais, com exceção de equinos. A partir destes resultados analisados foi possível inferir que a IFD apresentou resultados satisfatórios, porém o IVCC não apresentou resultados favoráveis para ser utilizado como

uma técnica confirmatória, assim, faz-se necessário uma avaliação do fluxo estabelecido no diagnóstico do Laboratório de Virologia do IP.

Palavras-chave: Raiva, Imunofluorescência, Isolamento viral em camundongo, Isolamento viral em cultivo celular, Diagnóstico laboratorial.

COMPARATIVE STUDY AMONG DIRECT FLUORESCENT ANTIBODY, MOUSE INOCULATION TEST AND RABIES TISSUE CULTURE INFECTION TEST USED IN RABIES DIAGNOSIS

ABSTRACT

The laboratory diagnosis of rabies is of fundamental importance for the evaluation of suspected cases of rabies virus infection (RABV) and the techniques used must have high sensitivity and specificity, as well as speed in obtaining the results. In rabies diagnosis, confirmation of the result of the direct fluorescent antibody (FAT) through viral isolation (IV) is recommended. As mouse inoculation test (MIT) is being replaced by rabies tissue culture infection test (RTCIT) for ethical reasons, studies are needed to evaluate the use of the RTCIT technique in the routine diagnosis of rabies in the Pasteur Institute (IP). The objective of this study was to evaluate the flow of rabies diagnosis at the IP Virology laboratory, by means of statistical analysis by the index of concordance, sensitivity, specificity and accuracy of the FAT, RTCIT and MIT tests. For this evaluation, results obtained in the diagnostics routine of the Virology Laboratory of IP from 2008 to 2016 were used in 6,514 samples of Central Nervous System (CNS) from different animals. FAT was the technique that presented the best results of sensitivity (93.58%), specificity (95.90%) and accuracy (95.67%). For the RTCIT, the values of sensitivity, specificity and accuracy were lower than FAT with 70.42%, 86.16% and 84.62%, respectively. The concordance between the RTCIT and FAT was moderate with kappa quotient $k = 0.341$. The sensitivity, specificity and accuracy of the MIT was 89.58%, 100% and 98.97%, respectively. The concordance between the MIT and FAT, had a substantial k value (0.720). FAT, considered the gold standard, was effective in all animals, except horses. From these analyzed results it was possible to infer that the FAT presented satisfactory results, however the RTCIT did not present favorable results to be used as a confirmatory technique, thus, it is necessary to evaluate the flow established in the diagnosis of the Virology Laboratory of IP.

Keywords: Rabies, Direct fluorescent antibody, Mouse inoculation test, Rabies tissue culture infection test, Laboratory diagnosis.

Lista de abreviações e siglas

aa	Aminoácido
ABLV	<i>Australian bat lyssavirus</i>
ARAV	<i>Aravan lyssavirus</i>
a.C.	Antes de Cristo
AgV2	Variante antigênica 2
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BBLV	<i>Bokeloh bat lyssavirus</i>
BHK-21	<i>Baby Hamster Kidney</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CER	<i>Chick Embryo Related</i>
CPCR	Comissão Permanente de Controle de Raiva
CVS	<i>Challenge Virus Standard</i>
d.C.	Depois de Cristo
DRIT	<i>Direct rapid immunohistochemistrytest</i> /Teste rápido de imuno-histoquímica direta
DUVV	<i>Duvenhage lyssavirus</i>
EBLV-1	<i>European bat lyssavirus-1</i>
EBLV-2	<i>European bat lyssavirus-2</i>
et al.	E colaboradores
G	Glicoproteína
GBLV	<i>Gannoruwa bat lyssavirus</i>
g	Gramas
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFD	Imunofluorescência direta
IKOV	<i>Ikoma lyssavirus</i>
INC	Inconclusivo
IP	Instituto Pasteur
IRKV	<i>Irkut lyssavirus</i>
IV	Isolamento viral
IVC	Isolamento viral em camundongos
IVCC	Isolamento viral em cultivo celular

k	<i>Kappa</i>
KHUV	<i>Khujand lyssavirus</i>
L	<i>Large</i>
LBV	<i>Lagos bat lyssavirus</i>
LLBV	<i>Lleida bat lyssavirus</i>
Le	<i>Leader/ líder</i>
M	Matriz
MEM	<i>Minimum Essential Medium/Meio Mínimo Essencial</i>
min	Minuto
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
µL	Microlitro
MOKV	<i>Mokola lyssavirus</i>
mRNA	RNA mensageiro
n	Número
N	Nucleoproteína
Neuro-2a	Neuroblastoma de camundongo
nm	Nanômetro
nt	Nucleotídeo(s)
OIE	<i>World Organisation for Animal Health/Organização Mundial de Saúde Animal.</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
P	Fosfoproteína
P.A.	Pura
PBS	<i>Phosphated buffered saline/Solução salina tamponada</i>
PCR	<i>Reverse transcription polymerase/Reação em cadeia pela polimerase</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
POS	Positivo
PI	Período de incubação
PV	<i>Pasteur virus</i>

RABV	Vírus da raiva
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína viral
rpm	Rotação por minuto
RT	<i>Reverse transcriptase</i> /Transcrição reversa
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> /Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real</i> /RT-PCR em tempo real
SHIBV	<i>Shimoni lyssavirus</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde
Tr	<i>Trailer</i>
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
WCBV	<i>West caucasian bat lyssavirus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1: Amostras recebidas para diagnóstico de Raiva distribuídas por espécies animais durante o período de 2008 a 2016. **48**

Quadro 2: Número de amostras com resultados positivos, negativos e inconclusivos obtidos pelas técnicas imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC) e isolamento viral em camundongo (IVC) distribuídos por espécies animais. **50**

Quadro 3: Amostras analisados pelas três técnicas com resultado inconclusivo na técnica de imunofluorescência direta (IFD) e resultado positivo no isolamento viral em cultivo celular (IVCC) e isolamento viral em camundongo (IVC). **52**

Tabela 1: Índice de concordância de *kappa* encontrados na comparação da técnica de isolamento viral em cultivo celular (IVCC) utilizando a técnica de imunofluorescência direta (IFD) como padrão ouro, entre diferentes espécies animais no diagnóstico da Raiva. **55**

Tabela 2: Índice de concordância de *Kappa* encontrados na comparação da técnica de isolamento viral em camundongo (IVCC) utilizando a técnica de imunofluorescência direta (IFD) como padrão ouro, entre diferentes espécies animais no diagnóstico da Raiva **57**

Tabela 3: Cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia entre as técnicas isolamento viral em cultivo celular (IVCC), isolamento viral em camundongo (IVC) utilizando a técnica de imunofluorescência direta (IFD) como padrão ouro no diagnóstico da Raiva nos diferentes espécies animais. **61**

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática do virion da raiva.	29
Figura 2: Esquema da estrutura do genoma do vírus da raiva (RABV). Os genes são separados por regiões intergênicas variáveis. As áreas não codantes do genoma são constituídas pelas áreas terminais 3' <i>leader</i> e 5' <i>trailer</i> e as áreas intergênicas.	30
Figura 3: Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da raiva (RABV), evidenciando-se os processos de adsorção, penetração, transcrição, tradução, replicação, maturação e liberação de novas partículas virais infectantes.	33
Figura 4: Fluxograma utilizado na rotina do Diagnóstico da Raiva no Laboratório de Virologia do Instituto Pasteur no período de 2008 a 2016.	44
Figura 5: Porcentagem de amostras recebidas para diagnóstico de Raiva distribuídas por espécies animais durante o período de 2008 a 2016.	49
Figura 6: Número de amostras com resultados positivos, negativos e inconclusivo obtidos pelas técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC) e isolamento viral em camundongo (IVC) nas diferentes espécies animais analisadas.	51
Figura 7: Cálculo da sensibilidade das técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC) e isolamento viral em camundongo (IVC) nas diferentes espécies animais analisadas.	58
Figura 8: Cálculo da especificidade das técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC) e isolamento viral em camundongo (IVC) nas diferentes espécies animais analisadas.	59

Figura 9: A) Impressão do Sistema Nervoso Central (SNC) de cão positivo submetidos à técnica de imunofluorescência direta (IFD). B) Impressão do SNC de cão negativo submetido à técnica de IFD. **98**

Figura 10: A) Camundongo da linhagem *Swiss Webster* infectado utilizando a técnica de isolamento viral em camundongo (IVC), com sintomatologia clínica condizente a Raiva (paralisia dos membros inferiores e pelos eriçados); B) Impressão de cérebro de camundongo infectado com o vírus da raiva submetidos à técnica de imunofluorescência direta (IFD) para confirmação do IVC **99**

Figura 11: A) Células Neuro-2a infectadas com vírus da raiva por meio da técnica de isolamento viral em cultivo de célula (IVCC); B) Células Neuro-2a não infectada, controle negativo. **100**

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. HISTÓRICO	22
1.2. TAXONOMIA DO VÍRUS	26
1.3. ESTRUTURA DO VÍRUS DA RAIVA	28
1.3.1. Morfologia do vírion	28
1.3.2. Genoma viral	29
1.3.3. Proteínas	30
1.3.4. Replicação.....	32
1.4. TRANSMISSÃO E SINTOMATOLOGIA	34
1.5. SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA RAIVA NO ESTADO DE SÃO PAULO.....	35
1.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	38
2. OBJETIVO.....	46
2.1. OBJETIVO GERAL	46
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	46
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1. AMOSTRAS	47
3.2. ANÁLISES DE DADOS	52
4. RESULTADOS	54
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÃO.....	79

7. REFERÊNCIAS	80
8. ANEXO	96
8.1 APROVAÇÃO CEUA.....	96
8.2. TECNICAS DE DIAGNÓSTICO DA RAIVA UTILIZADAS NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO IP AVALIADAS NESSE ESTUDO.....	97
8.2.1 Imunofluorescência direta (IFD)	97
8.2.2. Isolamento viral em camundongo (IVC).....	98
8.2.3. Isolamento viral em cultivo celular (IVCC)	99

1. INTRODUÇÃO

A Raiva é uma zoonose que afeta o Sistema Nervoso Central (SNC), de evolução aguda e fatal que acomete mamíferos (Fauquet et al., 2007). É uma das doenças mais antigas que se tem registro, pois existem relatos que fazem alusões à Raiva em 2.300 anos antes de Cristo (a.C.) na Mesopotâmia (Wilkinson, 1988).

Infelizmente, é uma doença que ainda nos dias atuais representa um sério problema de saúde pública, sendo estimadas 60.000 mortes de humanos anualmente no mundo (Fooks et al., 2017; Singh et al., 2017), apesar de existir a prevenção por meio da vacinação (Briggs & Hanlon, 2007). A Raiva está presente em todos os continentes, exceto na Oceania e Antártica, com mais de 95% das mortes humanas ocorrendo nas regiões da Ásia e África. As populações que vivem em áreas rurais remotas e mais pobres são as mais afetadas. Quando existe a necessidade de vacinas e imunoglobulinas, nem sempre estas estão disponíveis, pois o custo é muito elevado. O custo médio da profilaxia pós-exposição (PEP) à Raiva é de US\$ 40 na África, e US\$ 49 na Ásia. As vítimas mais frequentes globalmente, são as crianças com idades entre 5 a 14 anos (WHO, 2018a). Todos os anos, mais de 15 milhões de pessoas em todo o mundo recebem vacina após terem sido mordidas por um animal (Bourhy et al., 2009).

A penetração do vírus da raiva (RABV), no tecido, pode ocorrer por mordedura, lambedura, arranhadura, e este se move em direção centrípeta para o SNC. O neurotropismo evita ou limita a vigilância do sistema imunológico do hospedeiro, resultando na ausência de respostas de anticorpos (Smith et al., 1991; Boland et al., 2014). Assim, a exposição ao RABV pode resultar em uma infecção fatal em humanos, caso não ocorra em tempo hábil, a adoção de medidas específicas de prevenção como a vacinação e a soro-vacinação pós-exposição. O diagnóstico do RABV geralmente direciona para qual medida de prevenção deve ser tomada, como a adoção do esquema de vacinação (Dean & Albelseth, 1973).

Portanto, o diagnóstico é de extrema importância para o controle e prevenção da raiva, e o Instituto Pasteur (IP), Laboratório de Referência para Raiva no Brasil, tem a missão de “Contribuir para a Vigilância em Saúde por meio de vigilância epidemiológica, controle de risco e programas de capacitação e desenvolvimento relativos a Raiva e outras encefalites virais, abrangendo atividades de diagnóstico laboratorial, de pesquisa e inovação, a coordenação do Programa Estadual de Controle da Raiva, a profilaxia da Raiva humana, e o suporte aos municípios”. Vale ressaltar que o diagnóstico laboratorial é fundamental para elaboração de planos de profilaxia pós-exposição do RABV e para uma vigilância epidemiológica eficiente.

O teste de diagnóstico para identificação do RABV preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é a imunofluorescência direta (IFD), pois este é um teste altamente sensível, acurado e relativamente rápido, desenvolvido por Goldwasser & Kissling em 1958, sendo recomendado como técnica “padrão ouro”. Porém, por ser uma doença fatal a OMS recomenda a confirmação do resultado da IFD, por outra técnica, pois fatores externos podem influenciar o limiar de detecção do antígeno viral, como: o tempo entre o óbito do animal e a coleta do SNC; o tempo entre a coleta do SNC e o envio da amostra ao laboratório; a qualidade de conservação da amostra; a qualidade dos fragmentos encaminhados ao laboratório (Trimarchi & Nadin-Davis, 2007) e também a espécie animal (MS, 2008).

A acurácia do resultado da IFD depende também de diversas variáveis laboratoriais, tais como: experiência do examinador, qualidade do anticorpo anti RABV, funcionalidade do equipamento incluindo microscópio de fluorescência e qualidade das amostras e dos reagentes utilizados (WHO, 2018c). A técnica de IFD apresenta sensibilidade entre 95% a 100%, por isso é considerada padrão ouro e teste primário de triagem para o diagnóstico laboratorial da Raiva pela OMS (Germano, 1976; Dean, 1996; Rupprecht et al., 2014; WHO, 2018c).

Por todos esses fatores, a OMS recomenda uma prova confirmatória, o isolamento viral, podendo ser em cultivo celular (IVCC) ou em camundongos (IVC) (Germano, 1976; Rupprecht et al., 2014).

A importância do IVC no diagnóstico confirmatório, é a capacidade em detectar o RABV em amostras com pequena concentração de vírus, situação esta, que pode produzir resultados falsos negativos na IFD (Rudd & Trimarchi, 1989). Entretanto, a desvantagem desta técnica é o longo tempo requerido para o término do diagnóstico, podendo demorar até 30 dias para obtenção do resultado, e também o seu custo e as questões envolvendo a ética animal. Além disso, também é necessária uma demanda grande e contínua de fornecimento de animais.

O IVCC é uma técnica que, se bem desenvolvida e padronizada no laboratório pode ser amplamente utilizada para o diagnóstico confirmatório da Raiva, uma vez que o RABV pode ser isolado em cultura celular. É uma técnica relativamente fácil de realizar, com um custo aproximadamente cinco vezes menor que o IVC (Bones et al., 2015) e que reduz consideravelmente o tempo necessário para a obtenção dos resultados, podendo ser obtidos em quatro dias, enquanto que o IVC, o resultado pode demorar até 30 dias para ser concluído (Webster & Casey, 1996). Assim, a combinação de técnicas de diagnóstico usando a IFD e o IVCC tem sido utilizada nas últimas décadas (Umoh & Blenden, 1983; Chitra et al., 1988; Rudd & Trimarchi, 1987; Webster, 1987; King, 1996; Castilho et al., 2007).

Alguns estudos têm sido realizados comparando as técnicas de IFD, IVCC e IVC e os resultados indicaram que o IVCC é tão sensível quanto o IVC, quando demonstrada a replicação do vírus presente no tecido animal ou humano (Webster, 1987; Chitra et al., 1988; Rudd & Trimarchi, 1989). Vale ressaltar, que atualmente, em virtude do custo da técnica, do tempo de realização e por questões éticas, a técnica IVC não tem sido utilizada por muitos laboratórios internacionais com tanta frequência (Eggerbauer et al., 2017).

Alguns estudos indicam que a célula de neuroblastoma de camundongo (Neuro-2a), utilizada no IVCC, apresenta uma sensibilidade superior em relação às outras linhagens celulares (Umoh & Blenden, 1983; Rudd & Trimarchi, 1987; King, 1996), permitindo que essa linhagem seja

utilizada com segurança em uma rotina laboratorial para o isolamento do RABV (Rudd & Trimarchi, 1987).

Embora o IVCC tenha sido desenvolvido há muitos anos (Webster, 1987) essa técnica não tem sido amplamente implementada em países da América Latina, sendo estabelecida somente no Laboratório de Saúde Pública do Chile (Yung et al., 2018), no Instituto Pasteur da Argentina (La Rosa et al., 2018) e no IP de São Paulo (Castilho et al., 2007). Entretanto, não existem estudos dos autores do Chile e da Argentina mostrando a sensibilidade e especificidade da técnica de IVCC.

Exames de proficiência realizados em laboratórios mostram que a técnica de IFD é rápida e segura para o diagnóstico da Raiva, fato que tem levado muitos laboratórios a não utilizarem mais o diagnóstico por isolamento viral para confirmação do resultado. Atualmente nos EUA, estudos mostraram que em função da alta sensibilidade e especificidade em comparação com os métodos de isolamento viral para a Raiva, o teste de IFD é o método de diagnóstico recomendado para a determinação da doença em animais (WHO, 2018b).

Porém, apesar do avanço nos estudos relacionados ao diagnóstico e cura da Raiva, esta doença continua sendo fatal e por este motivo o Instituto Pasteur, sendo considerado um Laboratório de Referência Nacional para o Ministério da Saúde (MS) e Centro Colaborador da OMS, tem por excelência a necessidade de realizar estudos para avaliação dos testes empregados no diagnóstico da Raiva, sendo assim, possível estabelecer quais seriam os testes de diagnóstico mais adequados para a rotina do Laboratório e se seriam necessárias mudanças no algoritmo utilizado atualmente.

1.1. HISTÓRICO

Raiva é um termo derivado do latim *rabere* que significa fúria ou delírio, também teve sua origem no sânscrito *rabhas*, agir com violência (Steele & Fernandes, 1991).

A origem da Raiva na antiguidade recebe duas interpretações, uma interpretação dada pelos chineses e hindus na qual a enfermidade era vista como um desequilíbrio entre os elementos que compunham o organismo humano e a interpretação dada pelos egípcios, hebreus e outros povos, que era de caráter religioso (Barata, 1985).

A Raiva aparece como referência no código de *Eshunna* (cerca de 1930 a.C.) na antiga Mesopotâmia, sendo este um corpo legal da cidade com uma mistura de leis que tinham cerca de 60 artigos. Uma dessas leis penalizava os donos de cães que mordessem um homem e causasse a sua morte, e a penalidade seria então que o seu dono deveria pagar 2/3 de uma mina de prata (Ettinger, 1992; De Mattos et al., 2001).

Essa enfermidade foi somente descrita pela primeira vez por Demócrito, na Mesopotâmia 500 a.C., que fez o registro de Raiva em cães (Steele e Fernandes, 1991; Ettinger, 1992). Aristóteles no ano 322 a.C., descreveu a propagação da Raiva pela mordedura de cães, afirmando a sua transmissibilidade aos outros animais, com exceção do homem. Esta afirmação parece demonstrar que a Raiva humana era então desconhecida (Koprowski, 1996).

No século 1 depois de Cristo (d.C.), foi Aulo Cornélio Celso, um enciclopedista romano, que estudou o sintoma clássico da Raiva, e descreveu a importância da saliva dos animais na transmissão da Raiva, e considerou que outros animais, além do cão poderiam transmitir a doença (Koprowski, 1996). Os gregos concebiam os problemas da saúde, como por exemplo a Raiva, como inter-relação entre o homem e a natureza (Rosen, 1958). O Filósofo Plínio, no seu livro “História Natural”, publicado entre os anos de 77 e 79 d.C., foi quem descreveu que a Raiva poderia ser transmitida para os humanos por cães (Villaseñor, 1974; Baer, 2007).

O primeiro grande surto de Raiva descrito foi na França, em 1271, quando uma vila foi atacada por lobos raivosos e as 30 pessoas que foram a óbito tinham sido mordidas. Existem referências de surtos de Raiva na Espanha em 1500, na cidade de Paris em 1614 e em quase toda a Europa Central. Com o surgimento do surto da Raiva canina na cidade de Londres no

período de 1752-1762, foi ordenado o sacrifício de todos os cães errantes, que incluía uma taxa de recompensa por animal morto, levando então a um massacre desses animais. Essa prática foi utilizada em locais como Madri, onde 900 cães foram sacrificados em um único dia. Na Inglaterra, em 1779, não era permitido que os pobres tivessem cães (Steele, 1975). Em 1804, Zinke estuda a transmissão da Raiva e define a infecção por contato com a saliva de cães raivosos (Steele e Fernandes, 1991).

Galtier em 1879, inoculou extrato de tecido nervoso de coelhos com Raiva em cabras, carneiros e em animais de laboratório, com a intenção de induzir proteção imunológica nesses animais, e esses experimentos influenciaram Louis Pasteur em suas pesquisas com a Raiva (Wilkinson, 2002).

Em 1881, Louis Pasteur e seus colaboradores concluíram que o local da replicação do vírus da raiva era o SNC e que a inoculação intracerebral era a forma mais eficiente para a transmissão da doença. No ano de 1885, Pasteur através de passagens seriadas em cérebros de coelho conseguiu atenuar o vírus verificando que, após essas passagens, o vírus perdia o tropismo pelo SNC (Ferreira, 1976).

Em 06 de Julho de 1885, foi realizado o primeiro teste da vacina desenvolvida por Pasteur; era uma vacina de vírus atenuado, constituída de material dissecado da medula espinhal de coelhos, previamente inoculados com o vírus "fixo", que foi inoculado em um menino de nove anos que tinha sofrido várias mordeduras de um cão raivoso. Além da primeira dose, foram aplicadas mais 13 doses na criança e esta não desenvolveu a doença (Wilkinson, 2002).

Em 1903, Adelchi Negri detectou inclusão intracitoplasmática em neurônios de animais raivosos, sinal patognomônico da doença, e em 1913, estas inclusões tiveram reconhecido valor diagnóstico (De Mattos et al., 2001; Ferreira, 1976; Liebermann, 1988). Entretanto, a composição química desses corpúsculos só foi desvendada após a invenção do microscópio eletrônico (De Mattos et al., 2001), sendo os corpúsculos concentrações de proteínas virais que se localizam no citoplasma da célula infectada. Recentemente, Nikolic et

al. (2019) descrevem que os corpúsculos de Negri são organelas líquidas que concentram proteínas virais, ácidos nucleicos e alguns fatores celulares que provavelmente facilitam a replicação viral e protegem o genoma do vírus a partir de mecanismos de defesa celular e padrões moleculares associados ao vírus. Neste líquido, apesar de, ainda ser preciso caracterizar, deve haver uma interação sutil entre essas estruturas líquidas e as proteínas celulares que desencadeiam a resposta imune inata.

Carini em 1911, médico italiano, diretor do IP no período de 1906 a 1914, fez a primeira associação entre morcegos hematófagos e epizootias na América latina. Carini observou corpúsculos de inclusão de Negri em cérebros de bovinos agredidos por morcegos (Carini, 1911).

Em 1927, foi padronizada a técnica de Sellers para diagnóstico da Raiva, sendo uma técnica histológica que utiliza corantes de Sellers em impressões de diferentes porções do SNC e que identifica através desta coloração, os corpúsculos de Negri (Rupprecht et al., 2002).

Webster & Dawson em 1935 padronizaram a técnica de isolamento viral em camundongo a qual consiste na inoculação intracerebral do RABV em linhagem *Swiss*, sendo que a obtenção do resultado ocorre em até 30 dias (Koprowski, 1996).

A técnica de IFD foi desenvolvida em 1950 por Coons & Kaplan e subsequentemente modificada para o diagnóstico da Raiva por Goldwasser & Kissling em 1958. Essa técnica consiste na pesquisa de antígeno viral, com a adição da suspensão de anticorpo monoclonal anti RABV previamente conjugado com isotiocianato de fluoresceína.

O uso de linhagens de células para o cultivo do vírus da raiva foi primeiramente descrito em 1913 (Levaditi, 1913). Entretanto, pensava-se que as amostras de “vírus de rua” adaptavam-se lentamente ao cultivo em células e desta forma, esse procedimento não foi adotado na rotina laboratorial de diagnóstico (Meslin & Kaplan, 1996). Na década de 70, as linhagens celulares *Baby Hamster Kidney* (BHK-21), *Chick Embryo Related* (CER) e *Neuro-2a* foram identificadas como sistemas apropriados para o isolamento de “vírus de rua” (Larghi et al., 1975; Smith et al., 1977; 1978). Estudos posteriores

indicaram que a célula Neuro-2a é a mais susceptível à infecção pelo vírus da raiva (Umoh & Blendon, 1983, Rudd & Trimarchi, 1987; Webster et al., 1987).

A obtenção do clone Neuro-2a foi estabelecido e padronizado por dois pesquisadores Klebe RJ & Ruddle FH, a partir de um tumor espontâneo de um camundongo albino da linhagem A. Esta linhagem tumoral, designada C1300, foi obtida no Laboratório Jackson, Bar Harbor, Maine (ATCC, 2019).

Na década de 80, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, uma “amostra fixa” de laboratório, chamada *Challenge Virus Standard* (CVS) foi clonado em plasmídeo, o que permitiu deduzir a sequência de aminoácidos (aa) da glicoproteína viral (Yelverton et al., 1983). Tordo e colaboradores (1986), sequenciaram e analisaram o DNA complementar do genoma do RABV. A partir de 1990, os métodos moleculares foram propostos como alternativas para diagnóstico e estudos epidemiológicos (Jackson et al., 2013).

Recentemente, o teste rápido de imuno-histoquímica direta (DRIT) foi padronizado e validado e tem sido utilizado no diagnóstico da Raiva em muitos países em desenvolvimento como alternativa a IFD (Ruppercht et al., 2014; OMS, 2018; WHO, 2018c).

1.2. TAXONOMIA DO VÍRUS

O RABV apresenta tropismo pelo SNC de mamíferos, sendo classificado dentro do reino *Riboviria*, filo *Negarnaviricota*, subfilo *Haploviricotina*, classe *Monjiviricetes*, ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* gênero *Lyssavirus*, espécie *Rabies lyssavirus* (ICTV, 2019).

Até o início da década de 70, considerava-se o RABV como uma unidade antigênica. A partir da década de 80, baseando-se em propriedades antigênicas e imunogênicas, com o uso de anticorpos monoclonais, o vírus foi classificado em sete genótipos e dois filogrupos (Kotait et al., 2009). Recentemente, o gênero *Lyssavirus* apresenta 16 espécies distintas e uma subdivisão em três filogrupos (Fooks et al., 2017; ICTV, 2019), baseando-se em propriedades genéticas, por meio de relações filogenéticas.

O filogrupa I inclui: *Rabies Lyssavirus* (RABV), *Australian bat lyssavirus* (ABLV), *Duvenhage lyssavirus* (DUVV), *European bat lyssavirus-1* (EBLV-1) e 2 (EBLV-2), *Aravan lyssavirus* (ARAV), *Khujand lyssavirus* (KHUV), *Bokeloh bat lyssavirus* (BBLV), *Irkut lyssavirus* (IRKV) e *Gannoruwa bat lyssavirus* (GBLV). O filogrupa II inclui: *Lagos bat lyssavirus* (LBV), *Mokola lyssavirus* (MOKV) e *Shimoni bat lyssavirus* (SHIBV). Os vírus mais divergentes no gênero, *West Caucasian bat lyssavirus* (WCBV), *Ikoma lyssavirus* (IKOV) e *Lleida bat lyssavirus* (LLBV), está classificado dentro do filogrupa III (Fooks et al., 2017).

Das 16 espécies de *Lyssavirus* apresentadas, apenas o RABV está associado à Raiva clássica. As demais espécies podem ser denominadas como vírus aparentados ao vírus da raiva (*rabies-like viruses*) (Fauquet et al., 2007), e essas espécies que provocam a doença em mamíferos podem ser denominadas de lissavírose com sintomas semelhantes à Raiva clássica (Hanlon et al., 2005).

É importante salientar que a espécie RABV é amplamente distribuída pelo mundo com exceção da Oceania e Antártica, e é a única espécie encontrada nas Américas. As outras espécies também são encontradas nos continentes da África, Ásia, Europa e Oceania (Fisher et al., 2018).

Todos os *Lyssavirus* apresentam os antígenos do complexo ribonucleoproteico, os quais apresentam reação cruzada entre todos os membros das espécies e este fato é correlacionado com as distâncias relativamente curtas entre eles. Vale ressaltar que essa característica facilita a utilização de reagentes de diagnóstico padronizados para detecção de todos os *Lyssavirus* (Rupprecht et al., 2018).

1.3. ESTRUTURA DO VÍRUS DA RAIVA

1.3.1. Morfologia do vírion

O RABV tem uma das extremidades esféricas e outra plana, apresenta-se na forma de “bala de projétil”. O comprimento das partículas pode variar de 100 a 430 nanômetros (nm), apresenta em média 180 nm de comprimento e 80 de diâmetro (Lyles & Rupprecht, 2007). Possui uma simetria helicoidal, assim, os capsômeros que envolve o ácido nucleico estão em forma de s. O vírus é constituído de 2 a 3% de ácido ribonucleico (RNA), 67 a 74% de proteínas, 20 a 26% de lipídios, e 3% de carboidratos (Jackson et al., 2013).

A partícula viral é constituída por duas estruturas principais, o ribonucleocapsídeo ou ribonucleoproteína viral (RNP) e o envelope viral. A RNP é composta pelo RNA genômico associada à três proteínas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) e *large* ou RNA polimerase RNA dependente (L) (Fauquet et al., 2007). O envelope viral é composto por uma bicamada lipídica à qual estão associadas às proteínas matriz (M) e glicoproteína (G). A glicoproteína é a única proteína transmembranária e se projeta para o exterior com espículas glicosiladas constituídas por trímeros que sobressaem da superfície do vírion com comprimento de 9 nm (Wunner et al., 1985). A proteína M está localizada na superfície interna do envelope, circundando a ribonucleoproteína viral (Mebatsion, 2001), como representado na Figura 1.

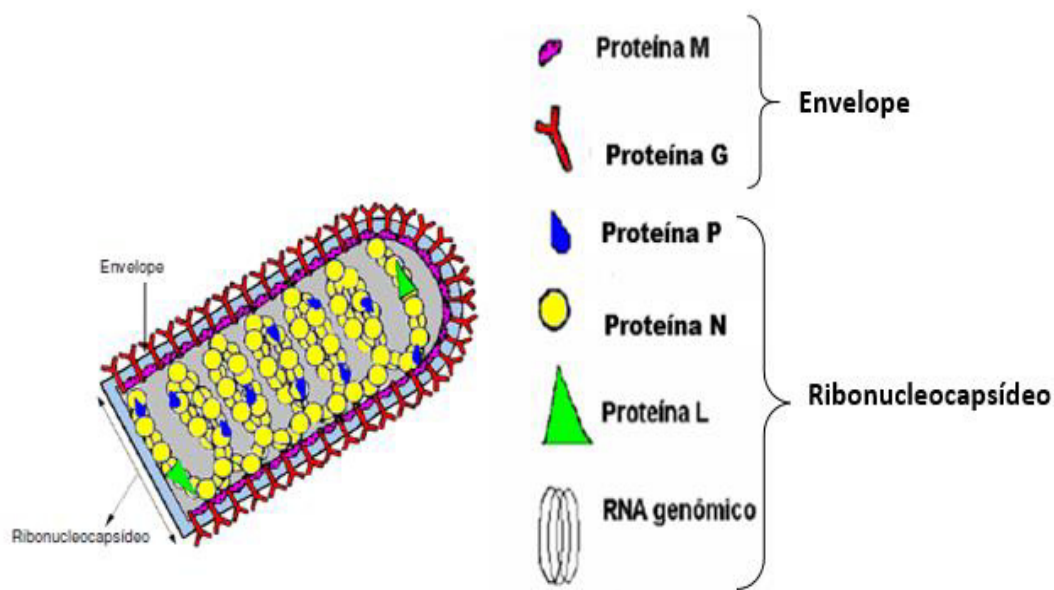


Figura 1: Representação esquemática do virion da raiva.
Fonte: Adaptado de Bourhy et al. (1990).

1.3.2. Genoma viral

O genoma do RABV na “amostra fixa” *Pasteur Virus* (PV) contém 11.932 nucleotídeos (nt) e consiste em um RNA genômico, linear e policistrônico com sentido negativo. O RNA genômico é codificado do extremo 3' (região amino terminal) para 5' (carboxiterminal) (Wunner, 2007).

Os primeiros 58 nt do genoma fazem referência a sequência de RNA líder (Le) não codificante (Wunner, 1991). O RNA Le atua de forma cis-sinal, o qual funciona como promotor para a RNA polimerase RNA dependente iniciar a transcrição do RNA genômico. Consequentemente, o RNA Le tem um papel fundamental na regulação da transcrição e da replicação do RNA genômico (Tordo & Poch, 1988).

Depois do RNA Le, a sequência do genoma é composta pelos cinco genes estruturais, que codificam as cinco proteínas virais: N, P, M, G e a L (Wunner, 2007).

No extremo 5', no final do genoma, há uma sequência de 69 nt, designado por *trailer* (Tr), que é o promotor para a síntese do antígenoma, de sentido positivo, necessário para a replicação do genoma com sentido

negativo (Tordo & Kouknetzoff, 1993; Conzelmann & Schnell, 1994; Whelan & Wertz, 1999).

As áreas entre os nucleotídeos 10 e 20 das regiões Le e Tr, possuem complementaridade quando comparadas, indicando ser uma área com as mesmas funções durante a transcrição e replicação (Tordo & Kouknetzoff, 1993). Essas áreas podem corresponder ao sinal de reconhecimento da RNA polimerase RNA dependente na transcrição e na replicação. Também existe uma perfeita complementaridade entre os 11 primeiros nucleotídeos das extremidades 3' e 5'. Dessa forma, a conservação das extremidades 3' e 5' do genoma e antígenoma são fundamentais para a transcrição e replicação (Wunner, 2002).

Além das sequências genômicas, existem também as sequências intergênicas do genoma, as quais variam em composição e tamanho e, em alguns casos, a região 5' do mRNA transcrito se sobrepõe à região 3' do gene seguinte. A região entre os genes N e P tem os nucleotídeos GA; a região entre os genes P e M tem a sequência de nucleotídeos GUCCG; a região entre os genes M e G tem GAUAA e a região intergênica entre os genes G e L chamada psi (Ψ) ou G-L é a mais extensa tendo em média, 423 nt (Tordo, 1996; Finke, et al., 2000). A descrição do genoma viral está esquematizada na Figura 2.

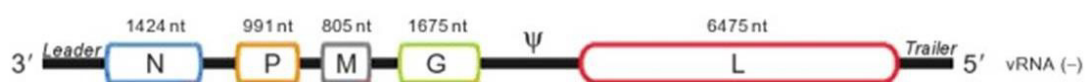


Figura 2: Esquema da estrutura do genoma do vírus da raiva (RABV). Os genes são separados por regiões intergênicas variáveis. As áreas não codantes do genoma são constituídas pelas áreas terminais 3' *leader* e 5' *trailer* e as áreas intergênicas.

Fonte Albertini et al. (2011).

1.3.3. Proteínas

Com cinco genes virais, o RABV codifica cinco proteínas virais, como já mencionado: G, M, P, L e N.

A proteína G possui 505 aminoácidos (aa) e exerce a função de proteína de fusão, que permite a entrada do vírus na célula. Além disso, é fundamental para a resposta imune contra o vírus da raiva, sendo responsável

pela indução e ligação de anticorpos neutralizantes. A glicoproteína tem importante papel na patogênese da doença e patogenicidade do agente (Wunner, 2007).

A proteína M é a menor proteína do vírus, sendo composta de 202 aa e forma uma bainha em volta da RNP produzindo o esqueleto do vírus. É também uma proteína multifuncional, que interage com outras proteínas virais e com os componentes das proteínas da membrana celular (Wunner, 1991). Está envolvida na montagem e liberação viral (Mebatsion, 2001).

A proteína P é um polipeptídeo fosforilado que contém 297 aa, interage com as proteínas N e L e acredita-se que atue como co-fator da L. A proteína P é multifuncional, ligando-se às outras proteínas virais para auxiliar na replicação do genoma viral interagindo com fatores celulares e, possivelmente, está associada à disseminação e patogênese viral (Lafon & Wiktor, 1985; Mebatsion, 2001).

A proteína L é a maior proteína do vírus, com 2.142 aa, originando, assim, o nome *large*. É também chamada de RNA polimerase dependente de RNA, responsável pelas atividades enzimáticas necessárias à transcrição e replicação do RNA viral (Tordo et al., 1988). Tem um papel fundamental no começo da infecção, em função da iniciação da transcrição primária do RNA genômico, uma vez que o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma da célula infectada. Outras funções desta proteína, como *capping* de mRNA, metilação e poliadenilação, continuam a ser delimitadas e mapeadas entre proteínas L das diferentes variantes do RABV (Wunner, 2007).

A proteína N é fosforilada, composta por 450 aa, sendo componente mais abundante do RABV e a mais conservada do vírus em termos de sequência de aa. Mesmo entre as espécies do gênero *Lyssavirus*, apesar de um grau relativamente alto de diversidade genética ser encontrado em algumas pequenas regiões do gene N nas diferentes espécies. Uma das razões do alto nível de conservação desta proteína é a sua função chave na encapsidação específica do RNA genômico, protegendo o mesmo das atividades de ribonucleases celulares e mantendo o RNA genômico em configuração adequada para a transcrição (Wunner, 2007). Isso faz com que

o gene N seja um alvo ideal para o desenvolvimento de métodos voltados ao diagnóstico.

1.3.4. Replicação

A replicação viral ocorre por meio da fixação do vírus na membrana da célula hospedeira, que é mediada pela proteína G, processo chamado de adsorção. Após esse evento, o vírus penetra na célula por endocitose formando um vacúolo lisossomal, que em seguida em função do pH ácido esse vacúolo se rompe juntamente com o envelope viral, ocorrendo a liberação da RNP no citoplasma celular. Logo após essa liberação, inicia-se a transcrição da fita de RNA viral de sentido negativo, em 5 RNAs mensageiros de sentido positivo. Esta transcrição é realizada pela proteína L do vírus, já que esta proteína é uma RNA polimerase RNA-dependente. A proteína L reconhece o promotor para a polimerização próximo à extremidade 3' do genoma viral, e a partir deste ponto a transcrição ocorre em direção à terminação 5', produzindo transcritos monocistrômicos consecutivos. Primeiro é gerado um pequeno RNA Le, depois são produzidos 5 RNAs mensageiros na sequência N, P, M, G e L (Tordo, 1996).

Em seguida ocorre o processo de tradução das proteínas nos ribossomos das células, somente a síntese da G ocorre no ribossomo do Retículo Endoplasmático Rugoso, sendo esta direcionada para o Complexo de Golgi para o processo de glicosilação. Somente após a tradução das 5 proteínas virais, é que tem início a replicação do genoma viral. Em primeiro lugar, ocorre à síntese do antígenoma de sentido positivo, que são moldes para a síntese do RNA genômica de sentido negativo (Tordo, 1996; Wunner et al., 2002). Logo depois que o antígenomas e genoma são produzidos, eles são recobertos por proteína N, para serem ativados (Banerjee & Barik, 1992; Tordo & Kouknetzoff, 1993).

No início da infecção, a presença de N ainda é pequena, a replicação viral é praticamente inexistente, porém, após a síntese de grandes quantidades de N, inicia-se a replicação do genoma do RABV. Portanto, a N é a responsável pela mudança entre transcrição e replicação (Tordo, 1996;

Wertz et al., 1987; Banerjee & Barik, 1992). Com isso a transcrição do RNA genômico ocorre com sentido positivo e o antígenoma, com sentido negativo (Wunner, 2007).

Com o término da replicação do genoma viral, os vírus são montados e liberados das células hospedeiras através de brotamento e adquire o seu envelope da célula hospedeira com a presença das proteínas G e M (Tordo, 1996). A Figura 3 mostra uma representação esquemática do ciclo de replicação do RABV.

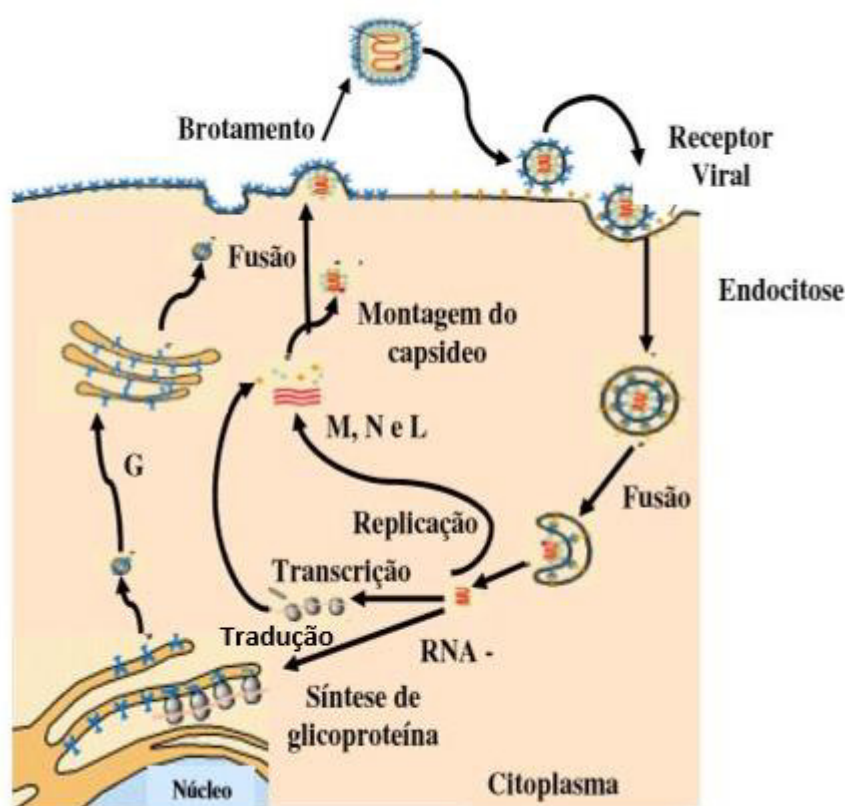


Figura 3: Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da raiva (RABV), evidenciando-se os processos de adsorção, penetração, transcrição, tradução, replicação, maturação e liberação de novas partículas virais infectantes.
Fonte: Pieri (2003).

É importante destacar que a replicação do vírus da raiva apresenta fidelidade limitada, devido ao fato de a RNA polimerase viral não apresentar atividade corretiva, levando variações nos genomas virais. Além disso, outros fatores como a duração da infecção, rota de transmissão, carga viral, resposta

imunológica do hospedeiro e interações com proteínas virais podem estar envolvidos na heterogeneidade das sequências de RNA (Kissi et al., 1995).

1.4. TRANSMISSÃO E SINTOMATOLOGIA

A via de eliminação clássica do RABV é a saliva do animal infectado, que transmite o vírus por meio de mordeduras, lambeduras ou arranhaduras (Acha & Szyfres, 1986). Após a inoculação, o vírus pode se replicar no sítio de inoculação, por horas ou semanas, ou seguir um curso centrípeto relativamente rápido, via tecido nervoso periférico, diretamente para SNC, com replicação e disseminação antes do desenvolvimento de uma resposta imunológica significativa. A partir do SNC, ocorre disseminação centrífuga do vírus gerando depósitos virais em diversos tecidos. A disseminação para as glândulas salivares, que representa a fase final da infecção, é importante para a transmissão do agente a outros indivíduos (Jackson et al, 1999; De Mattos et al., 2001).

O período de incubação (PI) da Raiva é extremamente variável após infecções naturais e dependem de fatores fundamentais, como a concentração do inóculo viral, o local da mordedura, a susceptibilidade da espécie exposta e imunidade do animal agredido (WHO, 2004), entretanto o desenvolvimento dos sintomas pode variar normalmente de 20 a 90 dias após a exposição (Fooks et al., 2017).

A sintomatologia clínica da Raiva é muito variada, as formas clássicas da doença incluem a forma furiosa e a forma paralítica. A forma furiosa que geralmente acomete os cães se caracteriza pela mudança no comportamento como: manifestação de irritabilidade, agressividade, tendência a morder objetos, outros animais e o homem, salivação e alteração na deglutição, falta de coordenação motora, paralisia do tronco e membros e, na fase final, convulsões generalizadas (Kotait et al., 2009).

Na forma paralítica da doença, que geralmente acomete bovinos, ocorre paralisia ascendente, falta de coordenação motora, ingestão de objetos estranhos e paralisia dos músculos de deglutição causando salivação

abundante. Estes sinais podem ser seguidos por depressão, coma e morte em consequência da parada respiratória (Jackson, 2000). Pode ocorrer ainda morte súbita do animal sem manifestação de sinais clínicos (Kotait & Carrieri, 2008).

1.5. SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA RAIVA NO ESTADO DE SÃO PAULO

Embora o RABV tenha a capacidade de infectar todos os mamíferos, observa-se que poucos destes hospedeiros atuam como reservatório do vírus da natureza, os quais pertencem principalmente às ordens *Carnívora* e *Chiropera* (Rupprecht et al., 2002). Porém nem todos os reservatórios do RABV pertencem a estas duas ordens, sendo a principal e bem estabelecida exceção a esta regra a linhagem de RABV mantida no nordeste brasileiro pelo *Callithrix jacchus* (sagui-do-tufo-branco) (Kotait et al., 2019).

São admitidos dois ciclos de transmissão para a Raiva, o ciclo urbano e o ciclo silvestre. O ciclo urbano tem o cão como principal reservatório e transmissor do vírus para outros cães, outros animais domésticos e para o homem. O ciclo silvestre é mantido por diferentes mamíferos silvestres terrestres e pelos quirópteros (Acha & Szifres, 2003).

O cão (*Canis lupus familiaris*) é responsável por 95% dos casos de Raiva humana relatados mundialmente (OIE, 2014). Porém, em alguns países da Europa e da América do Norte em que os programas de vacinação estão bem estabelecidos, o ciclo da Raiva é mantido principalmente por espécies silvestres como as raposas vermelhas, gambá, guaxinim, mangustos, chacais e morcegos (Blanton et al., 2012; Cliquet et al., 2014).

Na América Latina o número de casos de Raiva na população canina foi reduzido devido aos programas de imunização de animais domésticos iniciados na década de 70 (OPAS, 2001). Com o intuito de manter o compromisso de eliminação da Raiva em cães nas Américas, o Brasil pactuou as ações como cobertura vacinal por meio de campanhas de vacinação canina e felina, envio de amostras para os laboratórios de diagnóstico e

esquemas de pré e pós-exposição do vírus da Raiva em humanos (Brasil, 2010). Todas essas ações são fundamentais para o controle e vigilância da Raiva em animais domésticos e consequentemente a diminuição do risco de infecção em humanos.

Com o desenvolvimento dessas ações houve um decréscimo no número de casos de Raiva em cães no Brasil. Em 1980 foram registrados 4.570 casos de Raiva canina, enquanto em 2018, 11 casos foram confirmados, mas nenhum apresentou a variante antigênica 2 (AgV2), específica de cães (SVS/MS, 2019). Em consequência disso, houve uma redução significativa na incidência de Raiva humana, com 175 casos registrados em 1980 e 95 casos no período de 2005 a 2017, sendo que somente em 19 casos o cão foi a fonte de infecção (Wada et al., 2011; SVS/MS, 2019).

Muitos estados do Brasil não apresentam mais a circulação da Raiva canina pela variante 2, sendo que os últimos casos relatados de cães com essa variante foram no estado do Maranhão em 2017 (SVS/MS, 2019).

O estado de São Paulo foi pioneiro na ação de controle de Raiva em cães e gatos no Brasil, pois no final de 1973 foi estabelecida a Comissão Permanente de Controle de Raiva (CPCR), a qual adotou as recomendações de controle e profilaxia preconizadas pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), iniciando assim, uma política de vacinação em massa de cães e gatos, inicialmente nos grandes municípios, sendo incorporada progressivamente em outros centros urbanos no interior do estado (Takaoka, 2000).

Em decorrência disso, houve um decréscimo no número de casos de Raiva humana a partir de 1994 no estado de São Paulo (Takaoka, 2000), onde os últimos casos foram registrados em 2001 e 2018, ocorridos no município de Dracena e Ubatuba (Takaoka, 2003; SVS/MS, 2019). Em relação ao caso de 2001, o animal responsável pela transmissão foi um felino e a variante viral encontrada nesse animal foi compatível com a de morcego hematófago - *Desmodus rotundus* (Takaoka, 2003). O caso de 2018, o animal responsável pela transmissão foi o morcego (SVS/MS, 2019).

A circulação da AgV2 em cães, não é mais encontrada no estado de São Paulo desde 1999 (Kotait et al., 2001). No entanto, esporadicamente no estado de São Paulo são notificados casos de cães e gatos infectados com o RABV, sendo que, quando estes vírus foram caracterizados genética ou antigenicamente, todos foram tipificados como variantes antigênicas ou linhagens genéticas de RABV específicos de morcegos hematófagos e não hematófagos (Castilho et al., 2018). Diante dessa situação os morcegos adquiriram uma importância na epidemiologia da Raiva no estado de São Paulo, tanto no ciclo urbano quanto no ciclo silvestre.

Assim o perfil epidemiológico da Raiva no estado de São Paulo é semelhante ao descrito nos países desenvolvidos, uma vez que a variante canina não circula mais em animais domésticos. No entanto, casos de Raiva em cães, gatos, herbívoros, animais silvestres e humanos são relatados e são resultado de infecção por morcegos.

No período de 2002 a 2016, foram registrados no estado 29 casos positivos, sendo cães (n= 11) e gatos (n= 18) e em todos os casos a tipificação genética evidenciou uma transmissão por morcegos (Castilho et al., 2018; SVS/MS 2019). Nesse mesmo período também foram registrados 1.061 casos de morcegos positivos para Raiva, mostrando a importância do ciclo silvestre na transmissão da Raiva para animais doméstico no estado. Com relação aos herbívoros e outros silvestres, foram registrados entre 2011 a 2018, 1.370 e dois casos, respectivamente (dados Instituto Pasteur).

A introdução do ciclo silvestre da Raiva no meio urbano, provavelmente é decorrente do aumento da urbanização e desflorestamento de diversas áreas da região paulista, a qual permite um maior contato dos morcegos com o homem e com os animais domésticos. Isso tem favorecido a ocorrência da transmissão de Raiva entre animais domésticos e silvestres, fato que pode ocasionar a reintrodução da doença em áreas urbanas, nas quais a Raiva em animais domésticos apresenta-se sobre controle (Carnieli et al., 2006; Kotait et al., 2007; Kobayashi et al., 2007; Carnieli et al., 2008).

O estado de São Paulo pode ser considerado um exemplo no controle da Raiva em animais domésticos. A ampla vacinação dos animais associada

a diversas medidas de controle de populações de cães e gatos, além do trabalho constante de vigilância epidemiológica resultaram na eliminação da AgV2 circulante em cães no estado. O último caso de Raiva humana transmitida por cão (AgV2) foi em 1997 no município de Avanhadava, interior do estado (Takaoka, 2000).

Com essa conquista e com toda essa detecção na alteração do perfil epidemiológico da Raiva, os trabalhos de vigilância e o envio de amostras de animais suspeitos para o diagnóstico laboratorial que incluem caracterização genética são fundamentais para a manutenção desta situação e detecção de possíveis alterações nos ciclos epidemiológicos.

1.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A OMS e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) estabeleceram uma meta para a eliminação da doença da Raiva canina, AgV2, até 2030; um componente essencial para o sucesso desse objetivo é melhorar o diagnóstico e a vigilância da Raiva, especialmente nos países em desenvolvimento.

A técnica padrão ouro para diagnóstico laboratorial da Raiva é a IFD, sendo recomendada pela OMS como teste confirmatório o isolamento viral (WHO, 2018e).

Quando existe um caso suspeito de Raiva, o diagnóstico deve ser confirmado pelo laboratório o mais rápido possível, e requer também a segurança de que este resultado seja preciso, pois existem várias doenças patogênicas ou não que possuem sinais clínicos semelhantes a Raiva, porém essa é uma doença neurológica que progride para o óbito (De Mattos et al., 2001). Além disso, em casos de animais infectados, é preciso elaborar medidas de controle para que não haja uma possível epizootia em uma região, por isso o diagnóstico também deve ser rápido e preciso (Meslin, Kaplan, 1996).

No diagnóstico da Raiva o material encaminhado para o laboratório deve seguir as diretrizes do Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva.

Para cães, gatos, bovinos, equinos e outros ruminantes, o material encaminhado é o SNC coletado, já para morcegos e outros animais silvestres devem ser encaminhados inteiros para a realização da identificação das espécies. Todas as amostras devem ser enviadas ao laboratório em condições de refrigeração (até 24 horas após coleta) ou congelamento (após 24 horas de coleta), em recipiente hermeticamente fechado e identificado em isopor com gelo suficiente para manter a amostra refrigerada durante o transporte. Esses critérios são fundamentais para um diagnóstico preciso (SVS/MS, 2008).

A coloração de Sellers foi a primeira técnica utilizada no diagnóstico da Raiva. Esta técnica histológica consiste na coloração de impressões do SNC com corante de Sellers e na pesquisa por meio de microscopia óptica comum verificando a presença de inclusões citoplasmáticas denominadas corpúsculos de Negri. Porém, esses corpúsculos não estão presentes em todos os casos de Raiva, o que diminui a sensibilidade do diagnóstico e a OMS e a OIE não recomendam mais o uso do exame direto dos corpúsculos de Negri pela coloração de Sellers. Germano (1976) comparou a sensibilidade das técnicas de coloração de Sellers, IFD e IVC e verificou que a sensibilidades obtidas foram respectivamente: 81,3%, 96,5 % e 99,5 %.

O IVC tem sido utilizado por mais de um século, padronizada para o diagnóstico da Raiva por Webster & Dawson em 1935, esta metodologia consiste na inoculação intracerebral de uma amostra suspeita em linhagem *Swiss Webster*, e, na presença de sinais clínicos da doença é realizado eutanásia do animal e confirmado o resultado por IFD. A importância dessa técnica é a capacidade em detectar o RABV em amostras com baixa concentração viral por se tratar de uma inoculação *in vivo*, o que permite que a técnica tenha uma alta sensibilidade, próxima a 100%, (Germano, 1976; Centoamore et al., 2016; Corona et al., 2018). Entretanto, como já dito anteriormente, a desvantagem dessa técnica é o longo tempo requerido para o término do diagnóstico (período de observação do animal pode ser até 30 dias), bem como o seu custo e as questões éticas (Castilho et al., 2007).

O IVCC descrita por Webster (1987), além de ser mais rápido que o IVC, pois o tempo de incubação estabelecido pode variar de 2 a 4 dias, é também um método que não utiliza animais de laboratório para confirmação de diagnóstico. A técnica consiste na inoculação de material suspeito em células Neuro-2a, e após incubação de 96 horas em estufa de CO₂ a 5% é realizada a técnica de IFD, pois o vírus não causa efeito citopático na célula. Para essa técnica é utilizada um anticorpo anti RABV marcado com isotiocianato de fluoresceína, o qual na presença do antígeno se liga, e com o uso de microscópio de fluorescência observam-se inclusões citoplasmáticas fluorescentes (Dean et al., 1996). Para este processo é necessário: manutenção de células Neuro-2a, anticorpo anti RABV de alta qualidade, técnico qualificado, manutenção do microscópio de fluorescência e amostra com qualidade suficiente para o isolamento do vírus. As técnicas de IVC e IVCC não são utilizadas como diagnóstico primário, mas sim como teste confirmatório (WHO, 2018c).

Em 1958, a técnica de IFD foi adaptada para o diagnóstico de Raiva (Goldwasser & Kissling, 1958), a qual apresenta alta sensibilidade e especificidade, de fácil realização, baixo custo, e resultado rápido. Por esses fatores a OMS, preconiza a IFD como padrão ouro para o diagnóstico da Raiva, a qual apresenta uma sensibilidade de 95-100% em amostras frescas de SNC (Dean et al., 1996; WHO, 2018c), entretanto, esta pode ser comprometida em amostras autolisadas (Albas et al. 1999; McElhinney et al., 2014).

Essa técnica se baseia na detecção do antígeno viral em impressões de tecidos utilizando anticorpo específico contra o RABV conjugado a uma substância fluorescente (isotiocianato de fluoresceína) e examinado em microscópio de fluorescência. O antígeno do RABV reagindo com o anticorpo conjugado e submetido a luz ultravioleta (comprimento de onda de 260 nm), emite uma luz esverdeada fluorescente (Dean et al., 1996). A acurácia do resultado da IFD depende de diversas variáveis laboratoriais, tais como: experiência do examinador, qualidade do anticorpo anti RABV e outros reagentes e manutenção preventiva do microscópio de fluorescência (WHO,

2018c). Fatores externos também podem influenciar o limiar de detecção do antígeno viral: o tempo entre o óbito do animal e a coleta do SNC; o tempo entre a coleta do SNC e o envio da amostra ao laboratório; a qualidade de conservação da amostra e a qualidade dos fragmentos encaminhados ao laboratório e espécie animal avaliada (Trimarchi & Nadin Davis, 2007).

As técnicas moleculares vêm sendo amplamente utilizadas como ferramenta para o diagnóstico e caracterização molecular do RABV (Dantas Junior et al., 2004; Carnieli et al., 2006; Kimura et al., 2006; Fooks et al., 2009; Castilho et al., 2018). Essas técnicas moleculares têm sido utilizadas para o diagnóstico *antemortem* em humanos por meio de amostras de saliva e folículo piloso (Macedo et al., 2006; Castilho et al., 2013; Mani et al., 2014; Mani et al., 2016), material em estado avançado de decomposição (Oliveira et al., 2006; Castilho et al., 2018) e em situações de resultados discordantes nas técnicas de IFD e IV (Castilho et al., 2018).

Para Rupprecht et al. (2002), as técnicas moleculares utilizadas em conjunto com as técnicas já estabelecidas, podem reduzir o número de falso-negativos, consequentemente aumentando a sensibilidade do diagnóstico.

A RT-PCR baseia-se na transcrição reversa de determinado segmento do genoma viral, seguida de amplificação pela reação da polimerase em cadeia (Nadin-Davis, 1998; Nadin-Davis et al., 2002; Kimura et al., 2006). Na maioria dos estudos, os amplicons obtidos são submetidos à reação de sequenciamento e as análises filogenéticas, as quais permitem obter um maior conhecimento sobre as interações do vírus com seus hospedeiros (Carnieli et al., 2009; Oliveira et al., 2010; Favoretto et al., 2013; Kobayashi et al., 2013; Castilho et al., 2018).

Esta técnica não era adotada como teste diagnóstico primário para a Raiva em amostras de SNC *postmortem* devido a problemas na acurácia do diagnóstico, habilidade do laboratório no desempenho dos ensaios moleculares; e incompleta validação dos ensaios (Hanlon & Nadin-Davis, 2013; Fooks et al., 2009), no entanto, atualmente a OMS e a OIE reconhecem como teste primário para o diagnóstico da Raiva a IFD, o teste rápido de DRIT, a RT-PCR e a RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) (WHO, 2018d). É

importante salientar que as amostras positivas pelas técnicas moleculares devem ser submetidas ao sequenciamento genético para confirmação (WHO, 2018d).

O uso da RT-qPCR foi padronizado e validado pelo *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) para diagnóstico laboratorial da Raiva e está sendo utilizado nos laboratórios da rede nos Estados Unidos como teste confirmatório em amostras com resultados inconclusivos na IFD (Rupprecht & Nagarajan, 2014; Wadhwa et al., 2017; Gigante et al., 2018). O desenvolvimento de técnicas RT-qPCR permite a quantificação do RNA viral e garante um método rápido e sensível do ponto de vista analítico permitindo a detecção de pequenas quantidades de RNA viral (Fooks et al., 2009; Coertse et al., 2010) com o risco reduzido de contaminação devido ao sistema “tubo fechado” e não requerendo o processamento pós amplificação (eletroforese). A RT-qPCR pelo sistema *SYBR Green* de detecção de RNA do RABV (Nagaraj et al., 2006; Hayman et al., 2011), requer extremo cuidado para assegurar a especificidade analítica dos resultados (Nadin-Davis et al., 2009). Por outro lado, o sistema de RT-qPCR utilizando a sonda de hidrólise fluorogênica 5' exonuclease (*TaqMan*), assegura uma alta especificidade analítica em decorrência da reação de hibridização intrínseca da sonda (Hughes et al., 2004; Wakeley et al., 2005; Wacharapluesadee et al., 2008; Nadin-Davis et al., 2009).

O DRIT também tem sido recomendado como teste de diagnóstico primário pela WHO e OIE para diagnóstico *postmortem* da Raiva (WHO, 2018b). Esse teste consiste na impressão de SNC em laminas utilizando anticorpos monoclonais ou policlonais biotinilados específicos para o RABV, sistema de detecção complexo streptavidina-peroxidase, e por fim um cromógeno para revelação da reação. Foi padronizado e validado pelo CDC (Madhusudana et al., 2012) e apresenta vantagens em relação a IFD, quanto ao custo, pois a interpretação dos resultados é realizada em microscópio óptico, e também quanto ao tempo, pois permite um diagnóstico mais rápido (em média 2 horas). Assim, tem sido considerada uma técnica ideal para ser utilizado em condições de campo e em países em desenvolvimento (Lembo

et al., 2006; Dürr et al., 2008; Madhusudana et al., 2012). Essa técnica mostrou ter sensibilidade e especificidade igual a IFD (Lembo et al., 2006; Middel et al., 2017; Rupprecht et al., 2014).

Como o diagnóstico da Raiva deve ser rápido, devido ao vírus provocar uma infecção aguda a qual progride para óbito, é necessário que a técnica utilizada nesse diagnóstico possibilite resultado rápido e seguro. Dessa forma, as medidas específicas de controle como a vacinação e sorovacinação podem ser tomadas com maior segurança. A técnica de IFD atende esses requisitos (Dean et al., 1996). No entanto, é importante ressaltar que essa técnica nem sempre apresenta de 95 a 100% de sensibilidade (Rudd & Trimarchi, 1989; Chhabra et al., 2005), sendo, portanto, aconselhável conciliar a IFD com uma outra técnica confirmatória, sendo o isolamento viral em camundongos ou em células recomendado pela OMS (Koprowski, 1996). O grande problema do IVC é a demora na obtenção dos resultados, no entanto, é um teste altamente sensível que consegue detectar resultado positivo em amostras com pequenas concentrações virais, que muitas vezes resultam em falsos negativos na técnica de IFD (Rudd & Trimarchi, 1989).

Como dito anteriormente, a OMS preconiza a IFD como padrão ouro e o IV como teste confirmatório para diagnóstico da Raiva. O Instituto Pasteur realiza no Laboratório de Virologia como rotina a IFD como teste primário no diagnóstico de Raiva, e até 2007 todas as amostras eram confirmadas com a técnica de isolamento viral em camundongo. Em 2007, Castilho e colaboradores padronizou o IVCC, na Instituição. Esta técnica começou a ser utilizada como técnica confirmatória, no início para as espécies animais de morcegos, e a partir de 2008 outras espécies animais também foram analisadas por IVCC. Contudo, agressores e amostras com resultados inconclusivos foram analisadas também no IVC, perfazendo assim a análise do diagnóstico com três técnicas laboratoriais, sendo estas a IFD, o IVCC e o IVC. Vale ressaltar, que o fluxo estabelecido era de que amostras de morcegos seriam analisadas apenas por IFD e IVCC e apenas em casos inconclusivos, este material seria também analisados no IVC. Amostras de espécies animais agressores, bovinos, equinos, pequenos ruminantes e

outros silvestres tinham como fluxo, analisar o material de impressão do SNC com a técnica de IFD e o inóculo realizado com a suspensão de SNC, seria analisado nas técnicas de IVCC e IVC concomitantemente. Cães e gatos eram analisados pela técnica de IFD e apenas os inconclusivos eram analisados pela técnica de IVC. O fluxograma de 2008 a 2016 está sendo demonstrado na figura abaixo:

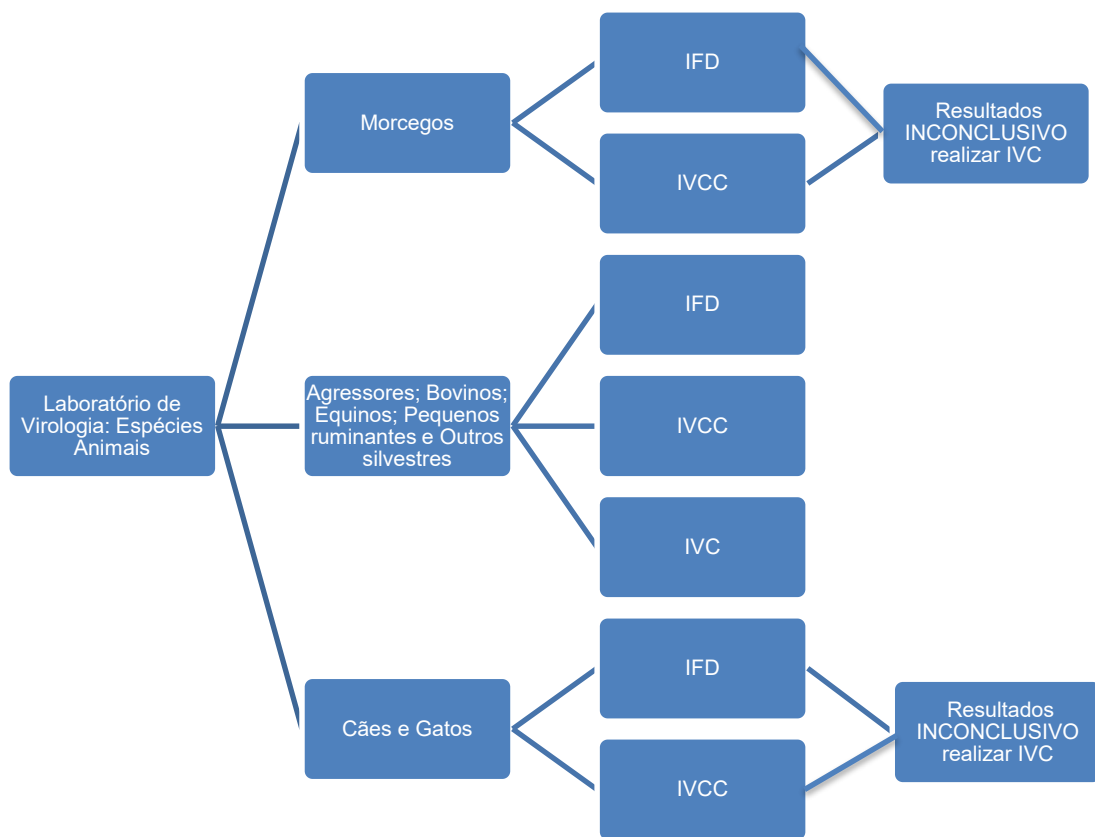


Figura 4: Fluxograma utilizado na rotina do Diagnóstico da Raiva no Laboratório de Virologia do Instituto Pasteur no período de 2008 a 2016.

No entanto, nem sempre este fluxograma era seguido e amostras aleatórias eram também enviadas para as três técnicas, assim como amostras que apresentavam resultados discordantes em uma das técnicas (IFD ou IVCC).

Assim para melhor avaliação das técnicas realizadas no Instituto Pasteur, após implementação do diagnóstico do IVCC, esse estudo avaliou a sensibilidade e especificidade das técnicas de IFD, IVC e IVCC em amostras de SNC de cães, gatos, bovinos, equinos, morcegos, pequenos ruminantes e outros animais silvestres enviadas para o IP no período de 2008 a 2016 e verificou se existe concordância entre as técnicas de IFD com IVCC e IFD com IVC com a finalidade de avaliar os testes de diagnóstico empregados na rotina do laboratório do IP.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar os testes de diagnóstico empregados na rotina laboratorial de Virologia do Instituto Pasteur (IP), por meio de análise estatística com índice de concordância entre as técnicas de isolamento viral em camundongos (IVC) e imunofluorescência direta (IFD) e também entre as técnicas de isolamento viral em células (IVCC) e IFD aplicadas no diagnóstico da Raiva, utilizando um levantamento de dados de resultados de amostras de Sistema Nervoso Central (SNC) de cães, gatos, bovinos, equinos, pequenos ruminantes, morcegos e outros animais silvestres recebidas e analisados no IP durante o período de 2008 a 2016, para assim, ser avaliado o fluxo de diagnóstico da Raiva no Laboratório de Virologia do IP.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar a sensibilidade, a especificidade relativa e a acurácia dos resultados obtidos das técnicas de IFD, IVC e IVCC nas diferentes espécies animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS

Foi realizado um estudo retrospectivo por meio de um levantamento de resultados de amostras submetidas às técnicas laboratoriais de diagnóstico da Raiva, incluindo IFD, IVCC e IVC, durante o período de 2008 a 2016. Foram selecionadas apenas as amostras de SNC que foram processadas pelas três técnicas.

As amostras selecionadas foram amostras de espécies animais cães, gatos, bovinos, equinos, pequenos ruminantes (cabra, ovelha e carneiro), morcegos e outros silvestres (bicho preguiça, lebre, veado, cervo, capivara, caxinguelê, cotia, esquilo, gamba, furão, jaguatirica, leão, lobo, lontra, primatas não humanos, onça, ouriço, quati, tatu, tamanduá, raposa).

Vale ressaltar que, no período estudado, a rotina de diagnóstico da Raiva do Laboratório de Virologia do IP utilizava o fluxograma conforme descrito na Figura 4.

Nesse estudo foram analisadas 6.514 amostras recebidas e diagnosticadas pelas técnicas de IFD, IVC e IVCC durante o período de 2008 a 2016, das espécies de animais citados acima, segundo o protocolo descrito por Dean et al. (1996), Koprowski (1996) e Webster & Casey (1996), respectivamente. A descrição das técnicas de IFD, IVC e IVCC, se encontram em anexo (Item 8.2).

Do total de amostras analisadas foi verificado que 2.566 (40%) foram cães, enquanto que o menor número foi de pequenos ruminantes que corresponde a 34 amostras (1%). O número de amostras distribuídas por espécie está descrito no Quadro 1. A Figura 5, mostra em porcentagem as espécies que foram analisadas para o diagnóstico de Raiva.

Esses dados mostram a importância do envio de amostras suspeitas dessas espécies por parte dos municípios, frente a situação epidemiológica atual, o que é evidenciado no nosso estudo pelo maior envio de amostras de cães, seguida por morcegos e gatos.

Quanto ao envio de amostras relacionadas a herbívoros (equinos, bovinos e pequenos ruminantes), existe um laboratório da rede da Agricultura, o Instituto Biológico, responsável pelo diagnóstico de Raiva desses animais, o qual muitos municípios enviam amostras para este local, o que justifica o baixo envio de amostras ao IP, embora atualmente temos um grande número de amostras desses animais positivos para Raiva (Quadro 2). Para os outros silvestres, o baixo envio de amostras se justifica pelo fato de não haver no estado uma política de parceria entre a polícia rodoviária para envio de amostras de animais atropelados. Jaboticabal é um município do estado que mais envia amostras de animais silvestres por existir uma parceria entre a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista e a polícia rodoviária (dados Instituto Pasteur).

Quadro 1: Amostras recebidas para diagnóstico de Raiva distribuídas por espécies animais durante o período de 2008 a 2016.

Animais	Número de animais	Porcentagem
Morcegos	1784	27%
Bovinos	480	7%
Cães	2566	39%
Equinos	350	5%
Gatos	914	14%
Pequenos ruminantes	34	1%
Outros silvestres	386	6%
TOTAL	6514	100%

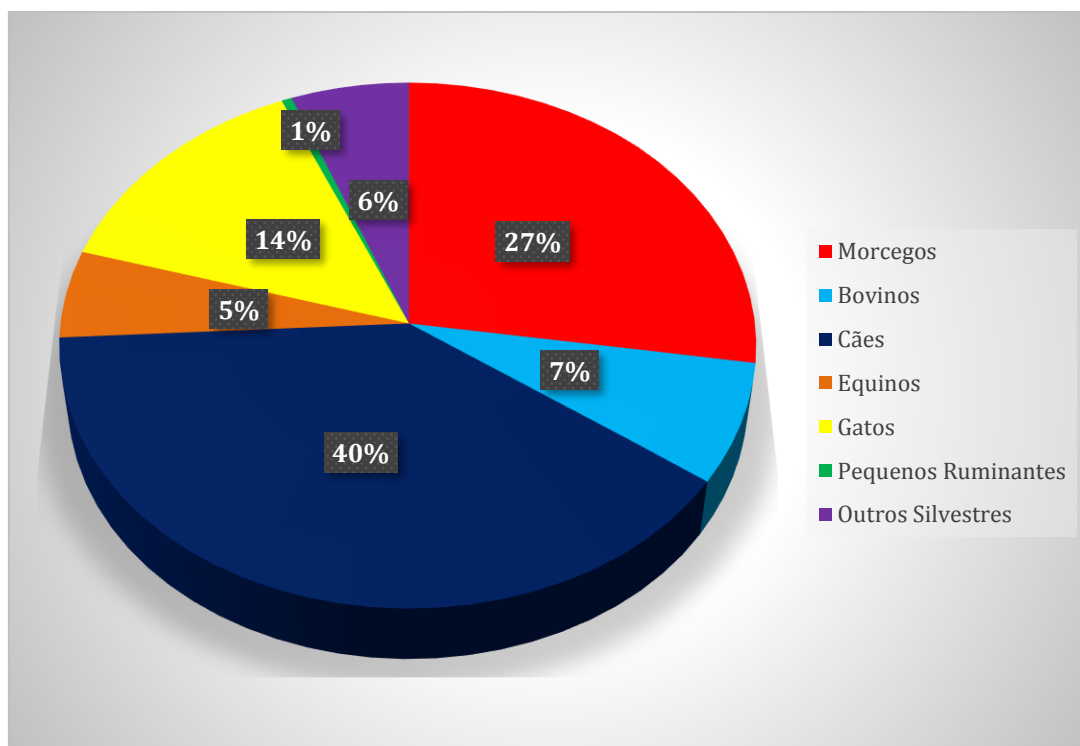


Figura 5: Porcentagem de amostras recebidas para diagnóstico de Raiva distribuídas por espécies animais durante o período de 2008 a 2016.

No Quadro 2 e Figura 6 são demonstrados os resultados positivos, negativos e inconclusivos de cada técnica avaliada por espécie. Destaca-se que a técnica com o maior número de resultados positivos foi a IFD (598 amostras), seguido pelo IVC (576 amostras) e IVCC (450 amostras). O IVCC (1002 amostras) foi o teste com o maior número de resultados inconclusivos, sendo que os morcegos apresentaram o maior número de amostras inconclusivas (536 amostras) na IVCC e seguida pela técnica de IFD (221 amostras). A técnica com o menor número de resultados inconclusivos foi o IVC com 67 amostras.

Quadro 2: Número de amostras com resultados positivos, negativos e inconclusivos obtidos pelas técnicas imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC) e isolamento viral em camundongo (IVC) distribuídos por espécies animais.

Animais	IFD			IVCC			IVC		
	Positivos	Negativos	Inconclusivos	Positivos	Negativos	Inconclusivos	Positivos	Negativos	Inconclusivos
Morcegos	315	1248	221	243	1005	536	288	1454	42
Bovinos	191	278	11	145	265	70	191	280	9
Cães	6	2541	19	5	2372	189	5	2560	1
Equinos	77	251	22	48	243	59	83	254	13
Gatos	5	901	8	7	782	125	5	907	2
Pequenos Ruminantes	2	32	0	1	28	5	2	32	0
Outros Silvestres	2	383	1	1	367	18	2	384	0
Total	598	5634	282	450	5062	1002	576	5871	67

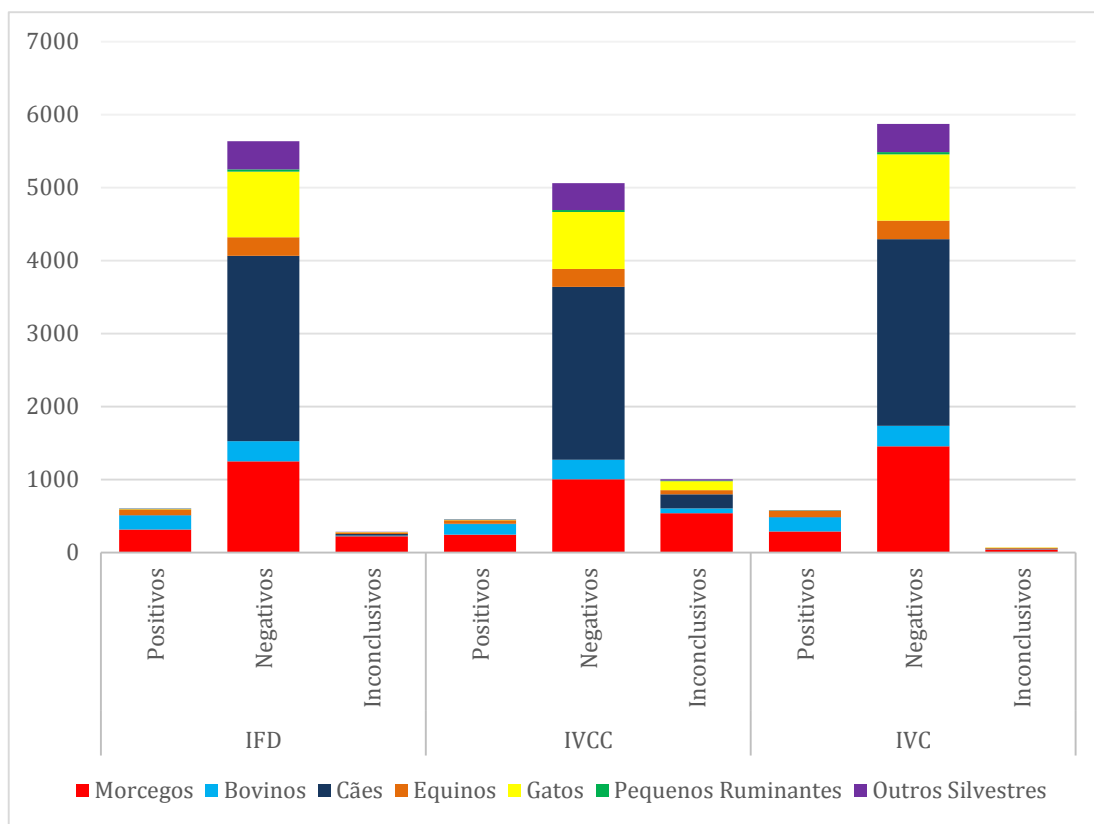


Figura 6: Número de amostras com resultados positivos, negativos e inconclusivo obtidos pelas técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC) e isolamento viral em camundongo (IVC) nas diferentes espécies animais analisadas.

No Quadro 3 estão demonstradas algumas amostras que no IVCC obtiveram resultados positivos, embora o resultado da IFD tenha sido inconclusivo. É importante destacar que nem todas as amostras que apresentaram resultados positivos no IVCC, foram positivas no IVC, para duas amostras inconclusivas no IVC a confirmação do diagnóstico positivo foi realizada por RT-PCR. Este quadro ressalta a importância de confirmação em relação as amostras inconclusivas na técnica de IFD.

Quadro 3: Amostras analisados pelas três técnicas com resultado inconclusivo na técnica de imunofluorescência direta (IFD) e resultado positivo no isolamento viral em cultivo celular (IVCC) e isolamento viral em camundongo (IVC).

REGISTRO	ESPÉCIE	IFD	IVCC	IVC
2734-V/2009	MORCEGO	INC	POS	POS
3177-V/2009	MORCEGO	INC	POS	POS
0066-V/2010	MORCEGO	INC	POS	POS
1666-V/2011	MORCEGO	INC	POS	POS
0817-V/2012	MORCEGO	INC	POS	POS
4863-V/2013	BOVINO	INC	POS	POS
4900-V/2013	BOVINO	INC	POS	POS
6106-V/2013	BOVINO	INC	POS	POS
0834-V/2014	EQUINO	INC	POS	POS
3101-V/2014	EQUINO	INC	POS	POS
3262-V/2014	GATO	INC	POS	POS
4035-V/2014	EQUINO	INC	POS	POS
1547-V/2016	MORCEGO	INC	POS	INC*
4202-V/2016	GATO	INC	POS	INC*

*Os resultados inconclusivos por IVC foram confirmados pela técnica de RT-PCR. INC= inconclusivo, POS= positivo.

3.2. ANÁLISES DE DADOS

Foram analisados os resultados obtidos na Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo, selecionando apenas as amostras em que as três técnicas tenham sido utilizadas, e esses resultados foram organizados em um banco de dados no Microsoft Excel® 2010, contendo informações sobre a data de entrada da amostra, espécie animal, e os resultados do diagnóstico pelas técnicas de IFD, IVCC e IVC. Esses resultados foram liberados no laudo como resultados positivo, negativo e inconclusivo. Os resultados inconclusivos geralmente são resultados em que

se teve dúvida, podendo ser interpretado estatisticamente como falso positivos ou falso negativo.

A análise utilizada para sensibilidade relativa e a especificidade relativa dos testes de IFD, IVCC e IVC, foram calculadas segundo Kawamura (2002), considerando-se o resultado final como verdadeiro positivo aquele obtido em pelo menos uma das técnicas. Também foi analisado a sensibilidade e especificidade e acurácia, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) utilizando o programa SSPS 21.

A sensibilidade é a capacidade que o teste diagnóstico/triagem apresenta em detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, de diagnosticar corretamente os doentes. A especificidade é a capacidade que o teste diagnóstico/triagem tem em detectar os verdadeiros negativos, isto é, de diagnosticar corretamente os indivíduos sadios. O valor preditivo positivo é a chance de o paciente ser, realmente, doente quando o teste der resultado positivo e o valor preditivo negativo é a chance do paciente ser, realmente, sadio, quando o teste tiver resultado negativo. A acurácia é o grau em que um teste é capaz de determinar o verdadeiro valor do que está sendo medido (Kawamura, 2002).

As análises estatísticas foram realizadas comparando a técnica IFD considerada padrão ouro, com as técnicas de IVCC e IVC, e comparando os resultados das técnicas entre as diferentes espécies avaliadas. Os dados levantados foram tabulados em planilha do Excel e exportados para o SPSS 21, tratados por meio de estatística descritiva, com cálculos de percentuais, frequências e apresentados em forma de tabelas, seguidas de discussão dos resultados obtidos.

O Índice *kappa* (*k*) foi utilizado como indicador de concordância entre as técnicas. O *k* informa a proporção de concordância não aleatória entre as provas biológicas, em que temos: valor de *kappa* 0= concordância pobre; valor de *kappa* 0-0,20= concordância ligeira; valor de *kappa* 0,21-0,40= concordância considerável; valor de *kappa* 0,41-0,60= concordância moderada; valor de *kappa* 0,61-0,80= concordância substancial; valor de *kappa* 0,81-1= concordância excelente (Landis & Kock., 1977).

4. RESULTADOS

A comparação das técnicas de IVCC com a IFD nas diferentes espécies avaliadas nesse estudo é demonstrada na Tabela 1. Nota-se que o índice de concordância de *kappa* variou de concordância ligeira em cães (0,066), gatos (0,064) e outros silvestres (0,083), para concordância substancial em bovinos (0,698). Em relação ao total de amostras a concordância foi considerável (0,341).

Tabela 1: Índice de concordância de *kappa* encontrados na comparação da técnica de isolamento viral em cultivo celular (IVCC) utilizando a técnica de imunofluorescência direta (IFD) como padrão ouro, entre diferentes espécies animais no diagnóstico da Raiva.

IVCC x IFD		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL	K
BOVINOS	positivo	144 (73,8%)	17 (6,0%)	161(33,5%)	0,698
	negativo	51 (26,2%)	268 (94,0%)	319 (66,5%)	
CÃES	positivo	9 (36,0%)	184 (7,2%)	193(7,5%)	0,066
	negativo	16 (64,0%)	2357 (92,8%)	2373 (92,5%)	
EQUINOS	positivo	45 (54,9%)	16 (6,0%)	61(17,4%)	0,537
	negativo	37(45,1%)	252 (94,0%)	289 (82,6%)	
GATOS	positivo	6 (54,5%)	125 (13,8%)	131 (14,3%)	0,064
	negativo	5 (45,5%)	778 (86,2%)	783 (85,7%)	
PEQUENOS	positivo	1 (50,0%)	4 (12,5%)	5 (14,7%)	0,220
RUMINANTES	negativo	1 (50,0%)	28 (87,5%)	29 (85,3%)	
MORCEGOS	positivo	260 (49,9%)	434 (34,4%)	694 (38,9%)	0,142
	negativo	261(50,1%)	829 (65,6%)	1090 (61,1%)	
OUTROS	positivo	1 (33,3%)	17 (4,4%)	18 (4,7%)	0,083
SILVESTRES	negativo	2 (66,7%)	366 (95,6%)	368 (95,3%)	
TOTAL	positivo	466 (55,5%)	797 (14,0%)	1263 (19,4%)	0,341
	negativo	373 (44,5%)	4878 (86,0%)	5251 (80,6%)	

Legenda: K= *kappa*. Valor 0 significa concordância pobre; valores de 0 a 0,20 significam concordância ligeira; 0,21 a 0,40 significam concordância considerável; 0,41 a 0,60 significam concordância moderada; 0,61 a 0,80 a concordância é substancial e valores maiores que 0,81 tem concordância excelente.

Fonte: Landis & Kock (1977).

A Tabela 2 demonstra a comparação das técnicas de IVC com a IFD nas diferentes espécies avaliadas nesse estudo. Em relação ao índice de concordância de *kappa* foi observado valores diferentes em relação as espécies, com variações de (0,331) até (1,000). Observa-se uma concordância excelente em pequenos ruminantes (1,000) e uma concordância considerável em cães (0,331). Em relação ao total das amostras a concordância foi substancial (0,720). Observa-se que, quando comparadas as técnicas de IVC com IFD, estas são mais concordantes do que as técnicas de IVCC com IFD quando comparado o total de amostras.

Tabela 2: Índice de concordância de *kappa* encontrados na comparação da técnica de isolamento viral em camundongo (IVCC) utilizando a técnica de imunofluorescência direta (IFD) como padrão ouro, entre diferentes espécies animais no diagnóstico da Raiva

IVC x IFD		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL	K
BOVINOS	positivo	183 (93,8%)	8 (2,8%)	191(39,8%)	0,913
	negativo	12 (6,2%)	277(97,2%)	289(60,2%)	
CÃES	positivo	5 (20,0%)	0	5(0,2%)	0,331
	negativo	20 (80,0%)	2541(100,0%)	2561(99,8%)	
EQUINOS	positivo	64 (78,0%)	19 (7,1%)	83 (23,7%)	0,707
	negativo	18 (22,0%)	249(92,9%)	262 (76,3%)	
GATOS	positivo	4 (36,4%)	1 (0,1%)	5 (0,5%)	0,496
	negativo	1 (20,0%)	901 (100%)	902 (99,6%)	
PEQUENOS RUMINANTES	positivo	2 (100,0%)	0	2 (5,9%)	1,000
	negativo	0	32 (100,0%)	32 (94,1%)	
MORCEGOS	positivo	270(51,8%)	18 (1,4%)	288 (16,1%)	0,580
	negativo	251(48,2%)	1245(98,6%)	1496 (83,9%)	
OUTROS SILVESTRES	positivo	2 (100,0%)	0	2 (0,5%)	0,799
	negativo	1 (33,3%)	383(100,0%)	384(99,5%)	
TOTAL	positivo	530 (63,2%)	46 (0,8%)	576(8,8%)	0,720
	negativo	309 (36,8%)	5629 (99,2%)	5938 (91,2%)	

Legenda: K= *kappa*. Valor 0 significa concordância pobre; valores de 0 a 0,20 significam concordância ligeira; 0,21 a 0,40 significam concordância considerável; 0,41 a 0,60 significam concordância moderada; 0,61 a 0,80 a concordância é substancial e valores maiores que 0,81 tem concordância excelente.

Fonte: Landis & Kock (1977).

A sensibilidade das técnicas de IFD, IVCC e IVC para todas as espécies avaliadas foi de 93,58%, 70,42% e 89,58%, respectivamente. Na técnica IFD a sensibilidade foi acima de 95% em quase todas as espécies, exceto em equinos (81,91%) e gatos (71,43%). O IVCC foi a técnica que apresentou os menores resultados de sensibilidade, sendo que os equinos (51,6%), outros silvestres (50%) e pequenos ruminantes (50%) apresentaram

os valores mais baixos. A técnica de IVC apresentou resultados de sensibilidade menores que IFD, demonstrando resultado superior a IFD apenas na espécie equina (86,46%) e resultados iguais em outros silvestres (100%) e pequenos ruminantes (100%) (Tabela 3, Figura 7).

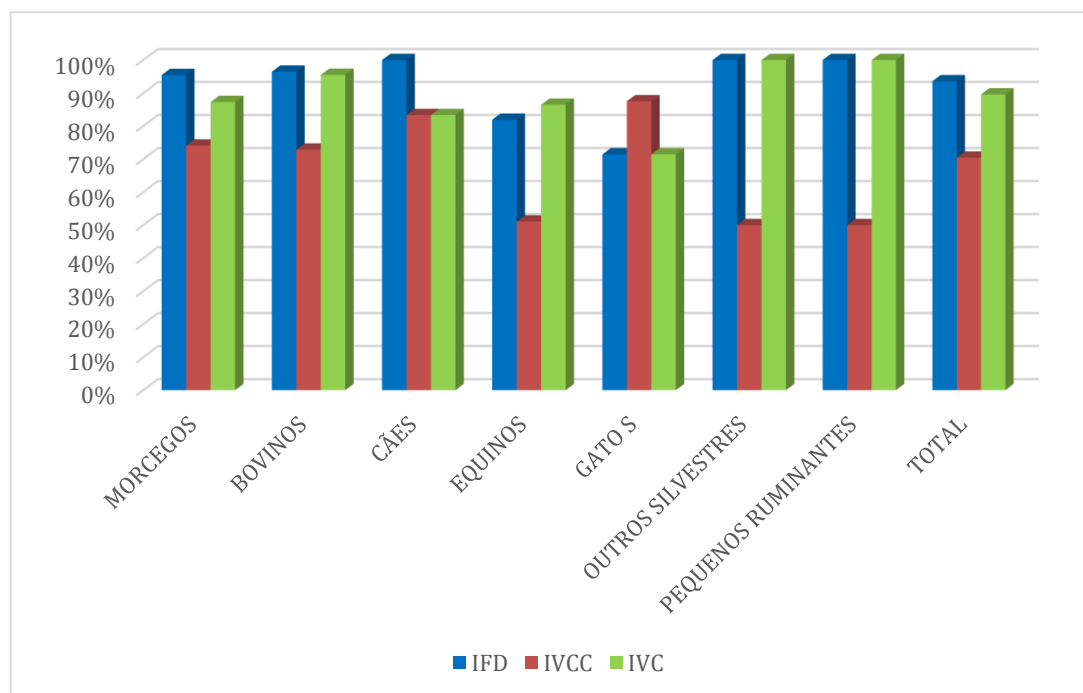


Figura 7: Cálculo da sensibilidade das técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC) e isolamento viral em camundongo (IVC) nas diferentes espécies animais analisadas.

A técnica de IFD apresentou uma especificidade acima de 95% para quase todas as espécies, avaliadas somente para morcegos (85,83%) a especificidade foi menor. A técnica de IVCC teve um valor acima de 92,66% em bovinos, cães, equinos e outros silvestres, enquanto os morcegos apresentaram especificidade de 69,02% (Tabela 3).

A especificidade observada na técnica de IVC, foi de 100% para todas as espécies (Tabela 3, Figura 8).

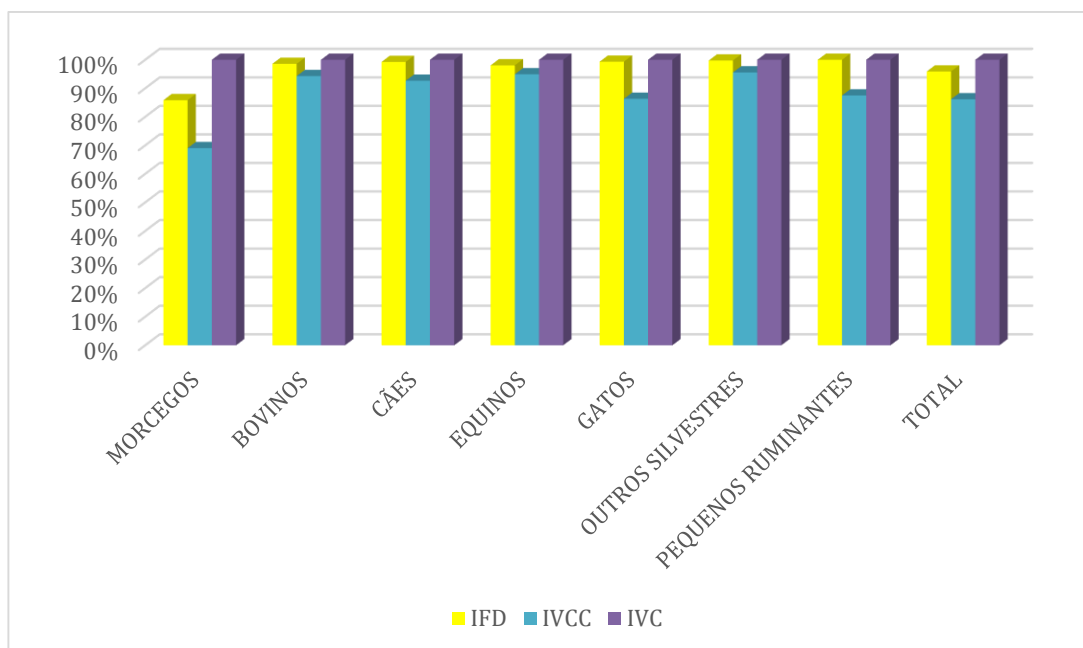


Figura 8: Cálculo da especificidade das técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC) e isolamento viral em camundongo (IVC) nas diferentes espécies animais analisadas.

Em relação a acurácia dos testes, observamos um valor de 95,67%, 84,62% e 98,97% para as técnicas de IFD, IVCC e IVC, respectivamente. Na IFD a espécie com menor valor de acurácia foi em morcegos com 87,61%, enquanto que em pequenos ruminantes a acurácia foi de 100%. O IVCC foi a técnica que apresentou o menor valor de acurácia entre as técnicas analisadas, sendo que em morcegos foi apresentado o menor valor com 69,66%, e pequenos ruminantes (95,34%) a maior acurácia. O teste de IVC apresentou o maior valor de acurácia entre os testes avaliados, sendo que os equinos apresentaram menor valor (96,29%), enquanto que outros silvestres e pequenos ruminantes apresentaram a acurácia de 100% (Tabela 3).

Em relação ao Valor Preditivo Positivo (VPP), os valores obtidos foram de 71,28%, 35,63% e 100% para as técnicas de IFD, IVCC e IVC, respectivamente. Nota-se que a técnica de IVC apresenta o melhor resultado para todas as espécies analisadas (Tabela 3).

O Valor Preditivo Negativo (VPN), para as técnicas de IFD, IVCC e IVC foi de 99,28%, 96,40% e 98,87%, respectivamente. Nota-se valores acima de 90% em quase todas as espécies e técnicas. Vale ressaltar que no IVCC

os bovinos (83,07%) e equinos (84,08%) apresentaram valores abaixo de 90% (Tabela 3).

Tabela 3: Cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia entre as técnicas isolamento viral em cultivo celular (IVCC), isolamento viral em camundongo (IVC) utilizando a técnica de imunofluorescência direta (IFD) como padrão ouro no diagnóstico da Raiva nos diferentes espécies animais.

Parâmetros	Ensaio	Morcegos	Bovino	Cão	Equino	Gato	Outros Silvestres	Pequenos Ruminantes	Total
Sensibilidade	IFD	95,45%	96,46%	100,00%	81,91%	71,43%	100,00%	100,00%	93,58%
	IVCC	74,09%	72,86%	83,33%	51,06%	87,50%	50,00%	50,00%	70,42%
	IVC	87,27%	95,50%	83,33%	86,46%	71,43%	100,00%	100,00%	89,58%
Especificidade	IFD	85,83%	98,58%	99,26%	98,05%	99,34%	99,74%	100,00%	95,90%
	IVCC	69,02%	94,31%	92,66%	94,92%	86,31%	95,57%	87,50%	86,16%
	IVC	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Acurácia	IFD	87,61%	97,71%	99,26%	93,71%	99,12%	99,74%	100,00%	95,67%
	IVCC	69,96%	85,42%	92,63%	83,14%	86,32%	95,34%	85,29%	84,62%
	IVC	97,65%	98,13%	99,96%	96,29%	99,78%	100,00%	100,00%	98,97%
VPP	IFD	60,46%	97,95%	24,00%	93,90%	45,45%	66,67%	100,00%	71,28%
	IVCC	35,01%	90,06%	2,59%	78,69%	5,34%	5,56%	20,00%	35,63%
	IVC	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
VPN	IFD	98,81%	97,54%	100,00%	93,66%	99,78%	100,00%	100,00%	99,28%
	IVCC	92,20%	83,07%	99,96%	84,08%	99,87%	99,73%	96,55%	96,40%
	IVC	97,19%	96,89%	99,96%	95,13%	99,78%	100,00%	100,00%	98,87%

5. DISCUSSÃO

No estado de São Paulo existem 6 laboratórios que fazem parte da rede de diagnóstico da Raiva, sendo o Instituto Pasteur o laboratório que recebe aproximadamente 60% das amostras de todas as espécies dos municípios do estado de São Paulo.

Essa doença acomete principalmente animais de produção e morcegos, sendo que 90% dos casos positivos ocorrem em morcegos em áreas urbanas desse estado (Kotait et al., 2007). Em nosso estudo foi evidenciado que a segunda espécie com maior envio de amostras, foram os morcegos, isso provavelmente se deve ao fato do morcego hematófago *Desmodus rotundus* ser o principal transmissor de Raiva aos herbívoros nas áreas rurais, e morcegos não hematófagos os principais transmissores para cães e gatos nas áreas urbanas. É importante ressaltar, que desde 1999 não circula mais a variante canina (AgV2), devido a medidas de ações estabelecidas pelo Programa de Controle da Raiva do estado de São Paulo (Kotait et al., 2001). No entanto, cães e gatos continuam se infectando com o RABV transmitido por morcegos.

Até 1998, quando ainda circulava a Raiva canina pela AgV2, o Instituto Pasteur recebia na sua grande maioria amostras de cães e gatos para diagnóstico. A partir de 1999, com a Raiva canina controlada, a vigilância epidemiológica começa a ter um olhar para as espécies de animais silvestres, principalmente os morcegos. Entre os anos de 1998 e 2001, 28 casos de Raiva ocorreram em cães e gatos (23 cães e 05 gatos); desses 28 casos apenas 22 foram submetidos à tipificação antigênica com a utilização de um painel de oito anticorpos monoclonais cedidos pelo CDC - Atlanta (Diaz et al., 1994), sendo 21 caracterizados como AgV3, própria de morcego hematófago *Desmodus rotundus* e apenas uma foi caracterizada como AgV2 (Kotait et al., 2001).

No período subsequente de 15 anos (2002 a 2016) foram registrados no estado 24 casos positivos de cães (n= 8) e gatos (n= 16) e em todos os casos a caracterização genética ou antigênica evidenciou a transmissão por

morcegos. Nesse mesmo período também foram registrados 1061 casos de morcegos positivos para Raiva (dados Instituto Pasteur), demonstrando a importância do ciclo silvestre na transmissão da Raiva para animais doméstico no estado.

O desenvolvimento das técnicas diagnósticas para Raiva mais apropriadas para aplicação na rotina laboratorial em países em desenvolvimento tem tido grandes avanços com a inovação de metodologias, as quais tem sido publicada internacionalmente pela OMS e OIE (WHO, 2018). O Instituto Pasteur por ser considerado Laboratório de Referência Nacional para Raiva, disponibiliza várias técnicas que auxiliam no diagnóstico da Raiva: IFD, IVCC, IVC e as técnicas de biologia molecular, incluindo RT-PCR, Nested RT-PCR e sequenciamento genético. Como a OMS preconiza que a técnica padrão ouro é a IFD e recomenda uma segunda técnica para confirmação laboratorial, o IP realiza atualmente a IFD juntamente com o IVCC. Por questões éticas, o IVC tem sido cada vez menos utilizado como prova confirmatória, por este motivo, na rotina laboratorial do IP é utilizado o IVCC como teste diagnóstico confirmatório para os resultados da técnica de IFD.

A partir de 2008, foram introduzidas na rotina do IVCC as amostras de cães, gatos, bovinos, equinos, pequenos ruminantes e outros silvestres. Para resultado inconclusivo nas técnicas de IFD e IVCC as amostras eram encaminhadas também para o IVC. Vale ressaltar que no IP, embora seja realizada a IFD e o IVCC, a liberação do laudo é dependente do tipo de animal: para cães, gatos, bovinos e pequenos ruminantes o resultado é liberado inicialmente com a IFD; já para morcegos e outros animais silvestres a liberação do laudo depende do IVCC. Em 2017, estabeleceu-se que as amostras de equinos, além da IFD e IVCC, também seria realizada a técnica de RT-PCR, sendo o resultado liberado somente com essas três técnicas.

No Quadro 2, pode-se observar que a técnica que obteve o maior número de resultado positivos foi a IFD (598 amostras), o que corrobora com a descrição de padrão ouro pela OMS e OIE. No entanto, a IFD apresentou 282 resultados inconclusivos, o que mostra a necessidade da realização de

outras técnicas para confirmação. De acordo com os dados desse estudo a técnica que mostrou o menor número de inconclusivos foi a IVC (67 amostras). Por outro lado, por questões éticas, econômicas e rapidez no laudo, o uso do IVC vem sendo substituído por outras técnicas como o IVCC, no entanto, essa técnica apresentou o maior número de resultados inconclusivos (1002 amostras). Vale destacar que os morcegos apresentaram o maior número de resultados inconclusivos em todas as técnicas.

Os morcegos têm o hábito de viver em colônias e muitas espécies podem dividir o mesmo ambiente, e como os estudos de epidemiologia molecular mostram que existem diferentes linhagens virais espécies específicas, estas podem circular em diferentes espécies de morcegos fazendo com que linhagens mais adaptadas à uma espécie seja transmitida a outras. Esse tipo de transmissão é conhecido como *spillover*, e esse conceito surge para qualquer vírus, quando este assume grande porcentagem de indivíduos de uma mesma espécie infectados, fazendo com que esta infecção atinja outros hospedeiros de espécies diferentes (Power & Mitchell, 2004). Esse conceito de *spillover*, já está muito bem documentado entre as diferentes espécies de morcegos com diferentes linhagens do RABV circulando entre elas (Kobayashi et al., 2005; 2007; Oliveira et al., 2010; Albas et al., 2011; Guarino et al., 2013; Menozzi et al., 2017). Nesses casos, a adaptação da linhagem viral a uma nova espécie pode determinar uma baixa carga viral dificultando o diagnóstico. Castilho et al. (2008), relataram o caso de um morcego da espécie *Eumops perotis* que apresentou resultado negativo na IFD e inconclusivo em IVCC, e no IVC os animais apresentaram sinais clínicos a partir do 17º dia, o que infere que essa amostra apresentava uma baixa concentração viral no SNC. Após a confirmação do diagnóstico por técnicas moleculares, a caracterização filogenética da amostra evidenciou a linhagem viral comumente circulante no gênero *Nyctinomops*.

Na análise estatística realizada em nosso estudo, a comparação das técnicas de IVCC com a IFD, mostrou que o índice de concordância de *kappa* foi de 0,341 para todas as espécies estudada (considerável). Para os bovinos, a concordância foi de 0,698 (substancial), ou seja, as técnicas apresentam

resultados semelhantes. Nessa comparação, obtivemos uma concordância ligeira em cães ($K= 0,066$), gatos ($K= 0,064$) e outros silvestres ($K= 0,083$). Em equinos, a relação IVCC x IFD foi de concordância moderada ($K= 0,537$), o que corrobora com o resultado encontrado por Souza (2019) que obteve concordância moderada ($K= 0,5216$) ao avaliar o diagnóstico da Raiva em 80 amostras de SNC de equinos. As espécies animais morcegos obtiveram uma concordância ligeira com o índice de *kappa* de $K= 0,142$ que sugere que esta técnica não é adequada para confirmação dos resultados inconclusivos da IFD.

Por outro lado, a comparação das técnicas de IVC x IFD, mostrou um índice de *kappa* total substancial, e excelente para as espécies animais (bovinos e pequenos ruminantes), e mesmo nos animais que obtiveram resultados mais baixos (cães, gatos e morcegos), o índice mostra concordâncias moderada e considerável o que mostra que essa técnica seria boa para o diagnóstico confirmatório.

Esta análise estatística demonstra que para a utilização da técnica de IVCC, na rotina laboratorial do IP, como já dito anteriormente, é necessário que seja utilizado um controle de qualidade rígido, que atue nas fase pré-analítica, analítica, pós-analítica. A fase pré-analítica é relacionada com a qualificação das amostras (recebimento, preparação e armazenamento) e com controle de qualidade específico. A fase analítica está relacionada com a aquisição de células Neuro-2a, nitrogênio para a manutenção do congelamento dessas células e preparo da suspensão das amostras (inóculo). E a fase pós-analítica, necessita de profissionais capacitados e a exata interpretação dos resultados. Provavelmente os resultados de concordância de *kappa* aquém do esperado seja decorrente desses fatores e talvez a validação da metodologia, avaliando principalmente a preparação do inóculo, conforme descrito por Webster & Casey (1996), possa melhorar os resultados obtidos por essa técnica.

Nesse estudo, a técnica de IFD apresentou sensibilidade de 93,58% comparada entre todas as espécies. A sensibilidade na maioria das espécies analisadas variou de 95,45% a 100%, sendo que somente os gatos e equinos

apresentaram sensibilidade abaixo de 95%. Em equinos a sensibilidade foi de 81,91%. Embora seja padrão ouro, Peixoto et al. (2000) mostrou que a IFD apresentou sensibilidade mais baixa (76,6%) quando se diagnostica Raiva em equinos em comparação com as demais espécies, resultando assim em resultados falsos negativos. Esses autores evidenciaram também, que equinos acometidos por Raiva, cerca de 60% das amostras não apresentaram formação de corpúsculos de inclusão característicos de Raiva, fato que pode colaborar com a dificuldade de identificação viral, podendo consequentemente gerar resultados falsos negativos. Bassuino et al. (2016) comparam a sensibilidade da técnica de IFD entre bovinos e equinos e confirmaram a redução da sensibilidade para a segunda espécie.

Como a progressão da doença nos equinos é mais rápida quando comparada com a Raiva nos bovinos, uma vez estabelecida a fase neurológica os equinos sobrevivem em apenas 3 a 4 dias, a formação e consequente visualização dos corpúsculos de Negri pode estar diminuída em intensidade nesta espécie (Peixoto et al., 2000). Trimarchi & Smith (2002) afirmam que a detecção do antígeno do RABV no SNC somente é possível quando o vírus atinge alta carga viral após a replicação viral, portanto em algumas situações nas quais as concentrações virais encontram-se abaixo do limiar de detecção em algumas estruturas como córtex cerebral, cerebelo e hipocampo poderia ocorrer diminuição da sensibilidade das técnicas utilizadas. Vale ressaltar que os equinos devido à proximidade com o proprietário, são submetidos à eutanásia com mais frequência do que bovinos e em consequência disso podem apresentar baixa carga viral, o que dificulta o diagnóstico.

Os antígenos do RABV detectados pela IFD geralmente estão disseminados por todo SNC na maioria dos animais acometidos com esta enfermidade. No entanto, naqueles com baixa carga viral, particularmente os da espécie equina, tendem a ter maior índice de positividade em algumas regiões específicas do encéfalo. Alguns autores acreditam que o hipocampo é a região eleita para diagnóstico da Raiva em equinos (Lepine, 1973; Tierkel, 1973; Lepine & Atanasiu, 1996). Carrieri et al. (2006) utilizando 55 amostras

de equinos, e avaliando regiões diferentes do SNC, nos testes de IFD e IVC apresentou a mesma sensibilidade para as regiões medulares do tronco cerebral e da medula cervical. Ambas essas regiões apresentaram maior sensibilidade do que as regiões do hipocampo, córtex e cerebelo. O tronco cerebral e medula cervical provou ser as melhores regiões para diagnóstico laboratorial para IFD e IVC. Souza (2019), verificou também variabilidade na intensidade da distribuição do vírus em diferentes partes do SNC de equinos (padrões neuroinvasivos) o que pode influenciar a detecção de RABV.

Assim como os equinos, os gatos apresentaram uma sensibilidade na IFD (71,43%) abaixo de 95%. Alguns trabalhos descreveram que resultados negativos em amostras de gatos ocorrem, mesmo quando essas amostras são positivas. Lucca et al. (2017), descreve o caso de um felino que foi diagnosticado como negativo na IFD, no entanto apresentou resultado positivo no IVC e após caracterização molecular foi detectado uma linhagem viral compatível com *Nyctinomops sp.*

Castilho et al. (2017; 2018), demonstraram o resultado de uma amostra de felino e uma amostra de cão, com resultados negativos na IFD, porém, pela técnica de IVC o vírus foi isolado no final do período de observação clínica dos camundongos, sugerindo uma baixa carga viral. Estas amostras foram confirmadas com RT-PCR, e o sequenciamento genético demonstrou linhagens compatíveis com a encontrada em morcegos, sendo no cão encontrada a linhagem compatível com *Desmodus rotundus*, e no gato a linhagem encontrada foi compatível com *Myotis sp.* inferindo o comportamento anômalo desses animais frente à detecção do RABV. Além disso, o tempo da doença clínica está diretamente relacionada à presença, tamanho, abundância do corpúsculo de Negri (Rupprecht, 2004), o que poderia explicar a dificuldade de detecção na IFD. Vale ressaltar que até 1998 a variante que circulava em cães e gatos era a AgV2, no entanto atualmente a linhagem que circula nesses animais é proveniente de morcegos.

A importância do teste de IFD baseia-se na suposição de que um animal com resultado diagnóstico negativo não tenha eliminação de vírus na saliva (Charlton et al., 1983). O vírus está presente na saliva de um animal

infectado somente após a replicação no SNC e subsequente dispersão centrífuga para as glândulas salivares. O teste de IFD com resultado negativo para a presença de vírus da raiva no tecido cerebral assegura que o contato com a saliva de um animal, por intermédio da mordedura, não transmita a doença (CDC, 2017).

Os resultados apresentados nesse estudo, demonstram que, através das análises estatísticas, a técnica de IFD apresenta uma boa sensibilidade. De acordo com WHO (2018), a sensibilidade da IFD varia de 95 a 100%, e neste estudo obtivemos 93% para todos os animais analisados, porém essa análise estatística menor que 95% se deve principalmente pelos resultados inconclusivos, obtidos nas amostras de equinos e gatos. O CDC, recentemente, apresentou um protocolo diferente, em que a amostra do SNC utilizada para o diagnóstico da Raiva pela técnica de IFD deve ser coletada utilizando uma secção transversal do tronco encefálico. Assim, o RABV pode ser distribuído unilateralmente, de modo disperso no tronco encefálico, aumentando a sensibilidade da técnica (WHO, 2018d).

Isso demonstra que o protocolo da técnica de IFD utilizado no IP deve passar por uma análise crítica para que se estabeleça um protocolo padronizado e validado, pois embora haja confirmação por outra técnica, a conduta médica é baseada no resultado da IFD (para cães, gatos, bovinos e outros ruminantes), e por isso há a necessidade de garantir um teste com uma boa sensibilidade, assegurando, deste modo, maior confiabilidade em seus resultados.

A técnica de IFD requer amostras em condições adequadas de conservação/refrigeração (WHO, 2018c). Durante o período desse estudo, as amostras de animais que foram enviadas ao IP e que eram consideradas “material ruim” ou em decomposição, foram analisadas na rotina laboratorial pelas técnicas de IFD e IVCC o que pode ter levado a muitos resultados falso negativos. Hoje no IP estas amostras já estão sendo separadas da rotina e sendo analisadas por IFD e confirmadas pela técnica de RT-PCR, fazendo com que diminua assim os resultados inconclusivos e falso negativos. Castilho et al. (2018) verificaram que no período de 15 anos (2002-2016) foram

registradas no Laboratório de Diagnóstico da Raiva do IP 20 casos positivos de cães e gatos por pelo menos uma das técnicas (IFD, IVCC, IVC e RT-PCR). Dessas 20 amostras, nove foram detectadas diretamente pela IFD e confirmadas posteriormente por outras técnicas; cinco apresentaram resultado inconclusivo e seis foram negativas na IFD e positiva por outra técnica, o que determina a necessidade de outras técnicas confirmatórias. Dessas seis amostras negativas, três foram oriundas de amostras em decomposição, sendo positivas somente pela técnica de RT-PCR.

Esses resultados demonstram que, em especial as amostras em decomposição e amostras com resultados inconclusivos na IFD devem ser submetidas a técnicas moleculares (RT-PCR e sequenciamento genético) para liberação de um resultado rápido e seguro, garantindo a profilaxia pós-exposição em tempo hábil para indivíduos expostos.

Alves (2020) realizou um estudo que teve como objetivo analisar criticamente a técnica de IFD no Laboratório de Virologia do IP, a fim de minimizar eventuais fatores externos que possam limitar ou diminuir sua sensibilidade e acurácia, pois o correto encaminhamento das amostras, bem como a qualidade do serviço laboratorial são fundamentais para a vigilância epidemiológica eficaz. Para isso, foram analisadas 7267 amostras de SNC de animais suspeitos de infecção pelo RABV, recebidas durante o ano de 2019. Desse total, 10 amostras, apresentaram resultados falso negativos na IFD, amostras provenientes das espécies animais morcegos (4), bovino (1) e equinos (5). Neste estudo a pesquisadora relata que a amostra da espécie animal bovino apresentou-se como “material ruim” concluindo assim, que amostras com resultados inconclusivos ou “material ruim” devem ser encaminhadas para a técnica de RT-PCR; e que espécies animais equinos com resultado negativos na IFD também devem ser encaminhados para RT-PCR devido a sua baixa sensibilidade para essa espécie. Nesse estudo realizado por Alves (2020) a sensibilidade para a técnica de IFD foi de 94,3% em todas as amostras, o que corrobora com o nosso resultado encontrado na técnica de IFD, que foi de 93,58% de sensibilidade em todas as amostras analisadas.

Em relação a técnica de IVCC, a sensibilidade foi menor do que a obtida pela técnica de IFD. Os resultados alcançados foram abaixo de 87,50%, demonstrando que deve ser realizada uma análise crítica no diagnóstico quanto a utilização desta técnica para confirmação do diagnóstico por IFD. Sasikalaveni et al. (2015) apesar de não especificar a espécie de animais utilizadas, analisaram cinco amostras e obtiveram uma sensibilidade de 100% na técnica de IVCC utilizando células Neuro-2a com cinco passagens do inóculo em células. Este processo de co-cultura das células infectadas com as células normais, foram realizadas por 48 h até a 5ª passagem, aumentando assim a carga viral destas amostras. Apesar do excelente resultado alcançado, esse protocolo é inviável para a rotina laboratorial do IP, uma vez que é recebida em média 6.000 amostras/ano. Madhusudana et al. (2010), realizaram um estudo com várias linhagens celulares, Neuro-2a, HEK-293 e BHK-21 e obtiveram respectivamente 100%, 100%, 25% de sensibilidade comparando com a IFD. Neste estudo, eles utilizaram 120 amostras de SNC de diferentes animais e humanos; cães (n= 55); gatos (n= 3); macacos (n= 4); bovinos (n= 4) e humanos (n= 10), essas amostras foram armazenadas a -75 °C, e não foi seguido protocolo descrito por Webster & Casey (1996), como realizado no nosso estudo. O protocolo utiliza células já confluentes e após 1 hora de adsorção a suspensão é retirada e em 24 horas as células são fixadas em acetona, sendo realizada em seguida a IFD para leitura. Este estudo demonstra que o armazenamento adequado das amostras contribui para uma melhor sensibilidade da técnica (Madhusudana et al., 2010).

Ao analisarmos a espécie morcegos, observa-se que a sensibilidade no IVCC foi de 74,09% (Tabela 3). Nogueira (2004) analisou 120 amostras de morcegos utilizando duas linhagens celulares diferentes e obteve 90% de sensibilidade e 95% de especificidade com as células Neuro-2a e McCoy quando comparada com o IVC. É importante salientar que a metodologia aplicada nesse estudo, baseia-se em duas passagens do inóculo em célula Neuro-2a o que colabora com um aumento da carga viral, porém este tipo de metodologia é ideal para laboratórios com uma demanda baixa de amostras.

Nos bovinos a sensibilidade encontrada no nosso estudo foi de 72,86%. Porém, Xavier (2005) obteve sensibilidade de 88,89% nessa espécie, entretanto ele utilizou a linhagem celular BHK-21 e utilizou apenas 18 amostras em sua análise. Yang e colaboradores (2012) também encontraram sensibilidade de 100% ao avaliar 12 amostras de bovinos, no entanto ele utilizou a célula neuroblastoma NG108-15 e fez uma incubação mais prolongada (120 horas). Kanitz e colaboradores (2015) testaram 48 amostras de bovinos com três protocolos diferentes no isolamento viral, sendo protocolo 1: com uma única passagem e incubação de 24 horas; protocolo 2: duas passagens em células e incubação de 72 horas; e protocolo 3: 3 passagens em células com incubação de 48 horas em cada passagem. Com o protocolo 1 os autores encontraram uma sensibilidade de 100% e concordância perfeita *kappa* 1. Centoamore e colaboradores (2016) obtiveram uma sensibilidade de 91,9% ao avaliar 80 amostras em bovinos, utilizando a mesma técnica e metodologia utilizada no IP.

As amostras analisadas de cães, demonstraram uma sensibilidade de 83,33% no IVCC. Castilho e colaboradores (2007), que também utiliza a mesma metodologia deste estudo obtiveram 48% de sensibilidade na técnica de IVCC utilizando 32 amostras somente. Robardet e colaboradores (2011) fizeram um ensaio Inter laboratorial para o diagnóstico da Raiva entre os anos de 2009 e 2010 que analisaram 11 amostras de cães enviadas para laboratórios participantes. Os 32 laboratórios selecionados compararam seus resultados entre si; porém os protocolos usados não foram idênticos entre os laboratórios, o que fez com que os resultados de sensibilidade do IVCC fossem bem diferentes, com muitos resultados falso positivos e falso negativos. Isso mostra que o protocolo aplicado no IVCC é importante para uma maior sensibilidade da técnica. Yang e colaboradores (2012) apresentaram sensibilidade de 100% utilizando células Neuro-2a em que foram utilizadas 110 amostras de SNC, sendo 84 amostras de SNC de bovinos, 14 cães e 12 de guaxinins, porém apenas 20 foram positivas na IFD e somente estas foram inoculadas no IVCC, a metodologia é a mesma

utilizada no IP, no entanto ela se difere quanto a preparação do inóculo, por este ser armazenado em -70°C e o inóculo no IP ser armazenado em -20°C .

A sensibilidade obtida em equinos pela técnica do IVCC neste estudo foi de 51,06%. No estudo realizado por Souza (2019) também foi encontrada uma sensibilidade baixa de 45,8%, entretanto, foi utilizada somente 25 amostras. Vale ressaltar que o protocolo seguido por Souza (2019) é o mesmo utilizado neste estudo. A autora, atribui a baixa sensibilidade pelo fato de realizar um “pool” das diferentes estruturas do SNC no IP, podendo gerar um viés metodológico, pois nas situações de baixa carga viral poderia ocorrer “diluição” dessas estruturas ao acrescentar outras estruturas que poderiam ter resultado negativo (sem vírus). Além disso, a distribuição do RABV não é homogênea no SNC de equinos (Silva et al., 1974; Carrieri et al., 2006; Silva et al., 2010) e, dependendo da estrutura enviada para diagnóstico, o resultado pode resultar em um falso negativo.

Em outros silvestres e pequenos ruminantes a positividade foi baixa, apenas dois casos. Estes foram diagnosticados positivos na IFD, no entanto a IVCC mostrou resultado inconclusivo. Dessa forma a sensibilidade da IVCC ficou com um valor baixo, no entanto, com a quantidade de amostras desse estudo não é possível considerar esse resultado fidedigno, estatisticamente falando.

Vale ressaltar que quando realizamos um estudo retrospectivo comparando técnicas de diagnóstico empregadas na rotina laboratorial com uma amostragem muito grande, existe uma complexidade e multiplicidade de processos distintos e inter-relacionados a serem controlados que envolvem a qualificação de amostras, fase pré-analítica, que dependem da coleta realizada, e do acondicionamento das amostras sendo que esse acondicionamento é determinante para manutenção da carga viral e infectividade viral. Todo material para diagnóstico deve ser acondicionado em freezer a -80°C . Deve-se também analisar o transporte utilizado, e o acondicionamento deste material durante o transporte.

Na fase analítica existe a necessidade de obtenção de produtos, tais como nitrogênio líquido para manutenção das linhagens celulares, pois a

susceptibilidade dessas linhagens celulares é fundamental para o diagnóstico laboratorial. Em qualquer teste diagnóstico, temos várias limitações, no teste de IVCC não é diferente. Uma das maiores dificuldades para se manter a rotina da técnica de IVCC é a aquisição e manutenção da linhagem de células, pois nesse teste existe a necessidade do uso da célula Neuro-2a a qual é de difícil importação. Vale ressaltar que as passagens existentes no Brasil são altas (acima de 300), o que compromete o resultado do teste. Pouliott e colaboradores (2017) que compararam a sensibilidade da Neuro-2a utilizando passagens intermediárias, altas e extremamente alta, usando técnicas de isolamento de vírus, neutralização sérica e RT-PCR em tempo real. As células foram examinadas microscopicamente para determinar alterações na morfologia e disseminação do antígeno do RABV entre células de passagem intermediárias, altas e extremamente altas. Células com passagem extremamente alta (≥ 1200 passagens) foram menos susceptíveis à infecção viral e / ou produziram menos vírus após a inoculação.

Na fase pós-analítica há correlação clínico laboratorial e a interpretação clínica dos resultados. A rápida evolução dos processos também tem exigido um melhor preparo dos profissionais e a adoção de ferramentas de gestão eficazes por parte dos laboratórios, para assegurar a qualidade dos resultados. A leitura, para resultado do IVCC, também irá depender da habilidade do técnico, principalmente, da sua capacidade de distinguir antígeno positivo da Raiva de fluorescência inespecífica. Outro fator que interfere diretamente no resultado do teste de IVCC é o anticorpo anti RABV (conjugado). Este deve ser o mesmo utilizado por todos os testes analisados, deve ter uma alta qualidade e não deve ter nenhum tipo de interferência como artefatos.

Apesar da IVCC ter apresentado o maior número de resultados inconclusivos, ela colaborou no diagnóstico da Raiva em que os resultados foram inconclusivos na IFD, porém com o número muito pequeno (Quadro 3) o que demonstra a importância de uma análise crítica para a avaliação dessa técnica para o diagnóstico confirmatório. Pois, vale ressaltar que o IVCC nesses casos foi até mais sensível que a IVC.

O Instituto Pasteur da Argentina, implantou em sua rotina a técnica de IVCC, utilizando o protocolo descrito por Webster & Casey (1996) com modificações relacionadas a quantidade de células, conservação da amostra a -80°C e preparação do inóculo (La Rosa, I., comunicação pessoal), porém o número de amostras recebidos na instituição permite um cuidado especial em relação ao preparo do inóculo, e isso pode ser fundamental para um resultado efetivo.

Outra técnica utilizada para diagnóstico da Raiva é o IVC, que é considerada o diagnóstico confirmatório dessa doença. Observa-se nos resultados obtidos nesse estudo que em morcegos, bovinos e cães a técnica apresentou sensibilidade menor que a IFD, sendo 87,27%, 95,50% e 83,33% (Tabela 3). Segundo Krammer (1992), é possível obter o diagnóstico positivo por essa técnica somente em situações em que o título viral apresente uma dose letal suficiente para matar 50% dos animais inoculados (DL50), portanto, a concentração das partículas virais necessárias é superior às aquelas concentrações do vírus encontradas em reservatórios silvestres ou amostras naturais. O que reafirmou o estudo realizado por Anderson (1982), em que o mesmo defende que o vírus circulante num reservatório é mantido em baixas concentrações para permitir a infecção e a manutenção da espécie que o alberga o que corrobora com os resultados obtidos em morcegos, que é um reservatório silvestre do RABV. É importante salientar que a carga viral a ser inoculada no camundongo não é fixa e também cada camundongo tem uma capacidade individual de responder a infecção. O IVC mostrou uma sensibilidade de 86,46% em equinos apresentando uma sensibilidade maior que a IFD, no entanto a baixa carga viral deve ter influenciado também no resultado obtido nesse estudo. Somente para pequenos ruminantes e outros animais silvestres o IVC teve sensibilidade de 100%, que provavelmente teve influência da baixa amostragem desses animais e não necessariamente das espécies estudadas.

Em relação a especificidade, a técnica de IFD apresentou em quase todas as espécies um resultado acima de 98%, o que corrobora com o estudo realizado por Alves (2020) que obtiveram 99,9% de especificidade em seu

estudo. Embora tenhamos obtido 98% de especificidade, foi observado que na espécie animal de morcegos foi encontrado uma especificidade de 85,83%. O IVCC assim como a IFD apresentou baixa especificidade em morcegos (69,02%), no entanto Nogueira (2004) apresentou resultado de 90% de especificidade em seu estudo, utilizando 120 amostras de morcegos em duas linhagens celulares diferentes Neuro-2a e McCoy, comparada com o IVC. Uma outra espécie que também apresentou especificidade baixa em nosso estudo foi em gatos, com 86,31% de especificidade, e quando avaliamos estas espécies (morcegos e gatos), verificamos que foram as duas espécies com maior percentual de inconclusivos (Quadro 2), o que deve ter interferido nos resultados obtidos nesse estudo. Apesar de cada vez menos utilizada por questões éticas, o IVC foi a técnica que obteve 100% de especificidade em todas as espécies.

A técnica de IFD apresentou valor de acurácia de 95,67% para todas as amostras de animais, sendo que as espécies animais cães, gatos, bovinos, outros silvestres e pequenos ruminantes, obtiveram um valor de acurácia com porcentagens entre 97,71% a 100%. Somente as espécies animais de morcegos e equinos obtiveram uma menor acurácia, de 87,61% e 93,71%, respectivamente. Porém a espécie animal de morcegos com acurácia de 87,61%, obteve o maior número de inconclusivos, por este motivo, estatisticamente esta espécie apresenta valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN alterados. Alves (2020) encontraram em seu estudo 99,8% de acurácia na técnica de IFD, utilizando, como dito anteriormente 7267 amostras, vale salientar que em seu estudo não foi calculado a acurácia por espécies animais. Em nosso estudo, na técnica de IVCC a acurácia obtida para todos os animais foi de 84,62%, demonstrando um valor baixo. Por outro lado, Corona et al. (2018) compararam as técnicas de IVCC e IVC utilizando 400 amostras de diferentes espécies de animais e obtiveram um valor de acurácia de 99,8% no IVCC, no entanto, os pesquisadores não mostraram quais espécies foram utilizadas nesse estudo, fato que pode interferir na acurácia, visto que nos resultados do nosso estudo

as amostras com maior dificuldade para estabelecer o diagnóstico foram de morcegos, gatos e equinos.

No VPP foram encontrados valores acima de 93,9% na técnica de IFD, nos bovinos, equinos e pequenos ruminantes. O que faz concluir que, para resultados positivos na técnica de IFD, não há necessidade de confirmação, pois o valor preditivo positivo de um resultado laboratorial é definido como sendo a probabilidade de que um resultado positivo seja verdadeiro, ou seja, represente a presença da doença. O valor preditivo negativo refere-se à probabilidade de que um resultado negativo seja verdadeiro, e ao observarmos, o VPN nas técnicas de IFD, IVCC e IVC obtiveram resultados no total das espécies de 99,28%; 96,40%; 98,87% respectivamente, demonstrando que para resultados negativos estas técnicas possuem um excelente critério de avaliação.

Atualmente, o diagnóstico realizado no IP para o RABV é baseado no uso de técnicas recomendadas anteriormente (IFD, IVCC e IVC), contudo, faz-se necessário a adoção de novas ferramentas aceitas pelos WHO e OIE (DRIT, RT-PCR e RT-qPCR) que possam melhorar o diagnóstico em termo de custos, rapidez na liberação do resultado e confiabilidade do teste. O DRIT é uma opção para diagnóstico da Raiva em áreas endêmicas, onde faltam recursos e o ônus da doença é alto (Fooks et al, 2017). Os ensaios moleculares são técnicas ótimas para o diagnóstico confirmatório, pois são menos propensos a subjetividade de interpretação e têm o benefício adicional de que pode identificar as linhagens de vírus, uma ferramenta útil nos casos com histórico indefinido de exposição potencial ao RABV (WHO, 2018d). Vale ressaltar que atualmente as técnicas de biologia molecular são reconhecidas pela WHO e OIE.

Ao longo dos anos com a experiência adquirida na rotina laboratorial houve aprimoramento das técnicas e foi evidenciada a necessidade de avaliar os resultados obtidos pelas técnicas de IFD, IVCC e IVC. Os dados obtidos nesse estudo demonstraram que a técnica de IVCC utilizada no IP não foi eficaz no diagnóstico confirmatório da Raiva, pois apresentou baixa sensibilidade e concordância de *kappa* aquém do esperado na maioria das

espécies. Portanto para um teste confirmatório o ideal seria a utilização de outras técnicas, como a RT-PCR já implantada na rotina do IP.

De acordo com estudo realizado por Robardet e colaboradores (2011) que compararam as diferentes técnicas para o diagnóstico da Raiva mostrou que a RT-PCR produz um baixo número de resultados falso negativos e foi a técnica que apresentou a maior sensibilidade. Bezerra (2017) realizou um estudo no IP e mostrou que a técnica de RT-PCR apresentou a maior positividade quando comparada a outras técnicas. Nesse estudo foram analisadas 29 amostras de equinos que apresentaram resultados discordantes por alguma técnica (IFD, IVCC, IVC e RT-PCR), entretanto essas amostras foram positivas em pelo menos uma dessas técnicas. O resultado encontrado foi uma positividade de 13,8% na IFD, 17,9% no IVCC, 34,5% no IVC e 96,3% na RT-PCR. Souza (2019) analisou 80 amostras de SNC de equinos no laboratório de diagnóstico do IP e obteve 100% de positividade pela técnica de RT-PCR quando comparada com a IFD.

Assim o resultado desse estudo sugere que seja revisto o fluxo da rotina laboratorial para o diagnóstico da Raiva no IP, com a finalidade de minimizar custos, tempo e maior confiabilidade nos resultados. Para isso é necessário: a) avaliação crítica do protocolo da IFD, validando a técnica para que seja realizada somente a técnica de IFD para as espécies de morcegos, cães, gatos, bovinos, pequenos ruminantes e outros silvestres, assim como é realizado em muitos laboratórios; b) no caso de IFD com resultado inconclusivos, sugere-se o emprego da técnica de RT-PCR já padronizada no Laboratório de Biologia Molecular para o diagnóstico da Raiva; c) para amostras de equinos com resultado negativo na IFD, o fluxo na rotina laboratorial determina que a amostra seja submetida às técnicas de IVCC e RT-PCR. Nossos resultados demonstram que a sensibilidade de IFD e IVCC foram baixas, assim sugere-se o encaminhamento da amostra da IFD somente para a técnica de RT-PCR, sendo liberado o resultado com as duas técnicas; d) amostras com resultados positivos na IFD não precisam de confirmação por outras técnicas. Porém no caso de amostras de morcegos positivas, sugere-se o encaminhamento da amostra para o IVCC ao invés do

IVC pois o SNC dos morcegos é pequeno, e com o IVCC é possível aumentar a carga viral e utilizar a amostra dessa espécie para estudos posteriores, e também minimiza o uso de camundongos; e) reforçar o fluxo correto para “amostras ruins” ou em decomposição, pois estas devem ser encaminhadas para IFD e se o resultado for negativo as mesmas devem ser encaminhadas para RT-PCR. O resultado só deverá ser liberado após a realização das duas técnicas; f) avaliar o uso da técnica de IVCC para o diagnóstico da Raiva, caso a decisão seja continuar utilizando a IVCC será necessário realizar uma validação.

Esse é o primeiro estudo retrospectivo no Brasil que realiza uma avaliação das técnicas utilizadas na rotina laboratorial de diagnóstico da Raiva. Os trabalhos realizados comparando as técnicas são de cunho científico e não avaliam o emprego das técnicas em uma rotina laboratorial.

Por meio desse estudo será possível realizar uma análise crítica em relação as técnicas empregadas na rotina do Laboratório de Virologia do IP, pois os resultados mostraram que são necessárias mudanças no algoritmo, pois as técnicas de diagnóstico confirmatórias não se mostraram eficazes. A IFD, considerada padrão ouro mostrou-se efetiva em todas as espécies, com exceção de equinos, os quais devem ser encaminhados para a técnica de RT-PCR.

6. CONCLUSÃO

Por meio das análises dos resultados obtidos nesse estudo pode-se concluir que:

- Em relação a concordância entre IVCC e IFD o índice de *kappa* total obtido foi 0,341 o que demonstra divergência entre os resultados obtidos entre estas técnicas, que provavelmente são decorrentes dos resultados inconclusivos da técnica de IVCC. Quanto aos valores obtidos de sensibilidade, especificidade e acurácia, o IVCC apresentou resultados inferiores a IFD.
- O IVC apresentou uma concordância com IFD superior ao IVCC, com índice de *kappa* de 0,720, o que demonstra que os resultados obtidos entre essas duas técnicas são mais próximos.
- A sensibilidade obtida nas técnicas de IFD, IVCC e IVC foi de 93,58%; 70,42% e 89,48% respectivamente, entre todos os animais, evidenciando a técnica de IFD como uma técnica eficiente para detectar a existência desta enfermidade, mostrou-se efetiva em todos os animais com valores acima de 95%, com exceção de equinos e gatos. A especificidade das técnicas de IFD e IVC obteve um excelente resultado, enquanto o IVCC teve valor inexpressivos para todos os animais confirmando não ser uma boa técnica confirmatória.
- Esses dados demonstram a necessidade de uma revisão no fluxo de diagnóstico da Raiva no laboratório de Virologia do IP.

7. REFERÊNCIAS

Acha PN, Szyfres B. Zoonoses y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2nd ed. Washington, D.C.: Organización Panamericana de La Salud, 1986; p.502-526. (OPS Publicación Científica, 503).

Acha PN, Szyfres B. Rabies. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3rd ed. Washington: Organización Panamericana de La Salud. Oficina sanitaria panamericana, Oficina regional de la organización mundial de la salud. 2003; p. 351-383.

Albas A, Ferrari CIL, Da Silva LHQ, Bernardi F, Ito FH. Influence of canine brain decomposition on laboratory diagnosis of rabies. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1999; 32(1):9-22.

Albas A, de Campos AC, Araujo DB, Araujo DB, Rodrigues CS, Sodré MM, Durigon EL, Favoretto SR. IV Molecular characterization of rabies virus isolated from non-haematophagous bats in Brazil. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical* 2011; 44:678–683.

Albertini AAV, Ruigrok RWH, Blondel D. Rabies Virus Transcription and Replication. *Advances. Virus Research*. 2011; 79: 2-19.

Alves NBS. Análise crítica da técnica de imunofluorescência direta no Diagnóstico Laboratorial da Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo. [TCC]. Trabalho apresentado para conclusão de curso do Programa de Especialização Profissional em Vigilância laboratorial da Raiva do Instituto Pasteur. 2020

American Type Culture Collection (ATCC) - 2019. Disponível em: <<http://www.atcc.org>> Acesso em: 17 de junho de 2019.

Anderson R, May R. Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* 1982; 85:411-426.

Baer GM. History of the Rabies. In: Jackson AC, Wunner WH (2 ed), Rabies. San Diego: Academic Press 2007.

Banerjee AK, Barik S. Gene expression of vesicular stomatitis virus genome rna. *Virology* 1992; 188: 417-428.

Barata RBC. A historicidade do conceito de causa. In: Barata R.B.C. Textos de apoio: Epidemiologia 1. Rio de Janeiro: ensp/abrasco; 1985; 13-27.

Bassuino DM, Konradt G, Cruz RA, Silva GS, Gomes DC, Pavarini SP, Driemeier D. Characterization of spinal cord lesions in cattle and horses with

rabies: the importance of correct sampling. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2016; 28(4): 455-60.

Bezzerra R. Avaliação do antígeno do vírus da raiva em amostras de sistema nervoso central de equinos pelo teste de imuno-histoquímica rápido indireto: estudo comparativo com as diferentes ferramentas diagnóstica disponíveis do Instituto Pasteur. [Monografia]. São Paulo: Instituto Pasteur de São Paulo; 2017.

Blanton JD, Dyer J, McBrayer J, Rupprecht CE. Rabies surveillance in the United States during 2011. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2012; 241(6): 712-722.

Boland TA, Mcguone D, Jindal J, Rocha M, Cumming M, RupprechtCE, Barbosa TFS, Oliveira RN, Chu CJ, Cole AJ, Kotait I Kuzmina NA, Yager PA, Kuzmin IV, Hedley-Whyte T, Brown CM, Rosenthal ES. Phylogenetic and epidemiologic evidence of multiyear incubation in human rabies. *Annals of Neurology* 2014; 75:155-60. doi:10.1002/ana.24016.

Bones VC, Gameiro AH, Castilho JG, Molento CFM. Comparative costs of the mouse inoculation test (MIT) and virus isolation in cell culture (VICC) for use in rabies diagnosis in brazil. *Alternatives to Laboratory Animals* 2015; 43: 81-87.

Bourhy H, Sureau P, Tordo N. From rabies to rabies related viruses. *Veterinary Microbiology* 1990; 23:115-28.

Bourhy H, Goudal M, Mailles A, Sadkowska-Todys M, Dacheux L, Zeller H. Is there a need for anti-rabies vaccine and immunoglobulins rationing in europe? *Euro Surveill* 2009; 14(13):19166.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Eletrônico Epidemiológico. Ano 10. n°2. Brasília (DF). 2010.

Briggs D, Hanlon CA. World rabies day 7: focusing attention on a neglected disease. *Veterinary Record*. 2007;161: 288-289.

Caporale GMM. Purificação de vírus da raiva e ribonucleoproteínas para produção de conjugados fluorescentes. [Dissertação]. São Paulo: USP/Instituto Butantan/IPT; 2005.

Carini A. Sur une grande epizootie de rage. *Annales de L'Institut Pasteur*, 1911; 25: 843-846.

Carnieli P, Brandão PE, Carrieri ML, Castilho JG, Macedo CI, Machado LM, Rangel N, de Carvalho RC, de Carvalho VA, Montebello L, Wada M, Kotait I. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. *Virus Research* 2006; 120(1-2):113-120.

Carnieli P, Fahl WDO, Castilho JG, Oliveira RDN, Macedo CI, Durymanova E Jorge RS, Morato RG, Spíndola RO, Machado LM, Ungar de Sá JE, Carrieri ML, Kotait I. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus Research* 2008; 131 (1): 33–46.

Carnieli PJR, Castilho JG, Fahl WO, Veras NMC, Carrieri ML, Kotait I. Molecular characterization of rabies virus isolates from dogs and crab-eating foxes in northeastern Brazil. *Virus Research* 2009; (141): 81-89.

Carrieri ML, Peixoto ZMP, Paciência MLB, Kotai I, Germano PML. Laboratory diagnosis of equine rabies and its implications for human postexposure prophylaxis. *Journal of Virological Methods* 2006;138 (1-2): 1-9.

Castilho JG, Iamamoto K, Lima JYOI, Scheffer KC, Carnieli PJR, Oliveira RN, Macedo CI, Achkar SM, Carrieri ML, Kotait I. Padronização e aplicação da técnica de isolamento de vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (Neuro-2a). *Boletim Epidemiológico Paulista* 2007; (4): 12-18.

Castilho JC, Canellol FM, Scheffer KC, Achkar SM, Carrieri ML, Kotait I. Antigenic and genetic characterization of the first rabies virus isolated from the bat *Eumops perotis* in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo* 2008; 50(2). <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652008000200006>.

Castilho JG, Rodrigues AC, Carnieli PJR, Oliveira RN, Silva ACR, Caporale GMM, Brandão PE, Batista HBC. Comparison of in vivo and in vitro transfection of antibodies against rabies. In: XXIV RITA Canada - Rabies in the Americas Meeting Abstracts, Toronto, Canada. 2013.

Castilho JG, de Souza DN, Oliveira RN, Carnieli P Jr, Batista HBCR, Pereira PMC, Achkar SM, Macedo CI. The epidemiological importance of bats in the transmission of rabies to dogs and cats in the state of São Paulo, Brazil, between 2005 and 2014. *Zoonoses Public Health* 2017; 64:423–430. <https://doi.org/10.1111/zph.12320>.

Castilho JG, Achkar SM, Oliveira RN, Mori E, Carnieli PJR, Macedo CI. Analysis of rabies diagnosis in dog and cats in the state of São Paulo, Brazil. *Archives of Virology* 2018; 163: 2369–2376.

CDC—Center for Disease Control and Prevention (2006) Protocol for postmortem diagnosis of rabies in animals by direct fluorescent antibody testing: a minimum standard for rabies diagnosis in the United States. https://www.cdc.gov/rabies/pdf/RabiesSDFAS_Pv2.pdf. Accessed 22 Aug 2017.

Centoamore NHF, Maiorka PC, Asano KM, Achkar SM, Scheffer KC, Fahl WO, Mori CMC, Mori E. Análise crítica do desempenho do isolamento viral em células como método substitutivo ao isolamento viral em camundongos no

diagnóstico da Raiva. Revista da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório 2016; (4): 45-81.

Charlton KM, Casey GA, Campbell JB. Experimental rabies in skunks: mechanisms of infection of the salivary glands. Canadian Journal of Comparative Medicine 1983; 47(3):363-369.

Chhabra M, Bhardwaj M, Ichhpujani RL, Lal S. Comparative evaluation of commonly used laboratory test for post mortem diagnosis of rabies. Indian Journal of Medical Microbiology 2005; 48: 190-93.

Chitra L, Pandit V, Kalyanaraman VR. Use of murine neuroblastoma culture in rapid diagnosis of rabies. Indian Journal of Medical Research 1988; 87: 113-16.

Cliquet F, Picard-Meyer E, Robardet E. Rabies in Europe: what are the risks? Expert Review of Anti-infective Therapy 2014; 12(8): 905-908.

Coertse J, Weyer J, Nel LH, Markotter W. Improved PCR methods for detection of African rabies and rabies-related lyssaviruses. Journal of Clinical Microbiology 2010; 48(11): 3949-3955.

Conzelmann KK, Schnell M. Rescue of synthetic genomic RNA analogs of rabies virus by plasmid-encoded proteins. Journal of Virology 1994; 68(2):713-719.

Coons AH & Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. Journal of Experimental Medicine 1950; 1-13.

Corona TF, Böger B, Rocha TC, Svoboda WK, Gomes EC. Comparative analysis of Mouse Inoculation Test and Virus Isolation in Cell Culture for rabies diagnosis in animals of Parana, Brazil. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2018; 39-43.

Dantas Junior JV, Kimura LMS, Ferreira MSR, Fialho AM, Almeida MMS, Gregio CRV, Romijn PC, Leite JPG. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rabies vírus detection. Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia 2004; 56 (3): 398-400.

Dean DJ, Ableseth MK. The fluorescent antibody tests. In: Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in Rabies. Geneva, World Health Organization, 1973.

Dean DJ, Ableseth MK, Atanasiu P. The Fluorescent Antibody Test. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in Rabies. 4^a ed. Geneva, World Health Organization 1996; 88-95.

De Mattos CA, De Mattos CC, Rupprecht CE. Rhabdoviruses. In: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology. 4^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; 2001:1245-1278.

Diaz AM, Papo S, Rodriguez A, Smith JS. Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin America and the Caribbean. Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B 1994; 41(3):153-60.

Dürr S, Naïssengar S, Mindekem R, Diguimbye C, Niezgoda M, Kuzmin I, Rupprecht CE, Zinsstag J. Rabies Diagnosis for Developing Countries. PLoS neglected tropical diseases 2008; 26:2(3): e206.

Eggerbauer E, Pfaff F, Finke S, Höper D, Beer M, Mettenleiter TC, Nolden T, Teifke JP, Müller, Freuling CM. Comparative analysis of European bat lyssavirus 1 pathogenicity in the mouse model. PLoS neglected tropical diseases 2017; 19:11(6): e0005668.

Ettinger S.J. Tratado de medicina interna veterinária. São Paulo: Manole; 1992.

Fauquet EM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy. In: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic press, CA, San Diego; 2007.

Favoretto SR, Mattos CC, De Mattos CA, De Campos ACA, Sacramento DRV, Durigon EL. The emergence of wildlife species as a source of human rabies infection in Brazil. Epidemiology and infection 2013; 141 (7): 1552-61.

Ferreira AJ. Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos, 3^a ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1976: 779.

Finke S, Cox HJ, Conzelmann KK. Differential transcription attenuation of rabies virus genes by intergenic regions: generation of recombinant viruses overexpressing the polymerase gene. Journal of Virology 2000; 74: 7261-7269.

Fisher CR, Streicker DG, Schnell MJ. The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers. Nature review microbiology 2018; 16(4): 241-255.

Fooks AR, Johnson N, Freuling CM, Wakeley PR, Banyard AC, McElhinney LM, Marston DA, Dastjerdi A, Wright E, Weiss RA, Müller T. Emerging technologies for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21st century. PLoS neglected tropical diseases. 2009; 3 (9): e530.

Fooks AR, Cliquet F, Finke S, Freuling C, Hemachudha T, Mani RS, Müller T, Nadin-Davis S, Picard-Meyer E, Wilde H, Banyard AC. Rabies is a life-

threatening neglected tropical disease: tens of thousands. *Rabies*. 2017; 3: 17091.doi: 10.1038/nrdp.2017.91.

Germano PML. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, Imunofluorescência direta e isolamento viral em camundongo aplicadas no diagnostico laboratorial da Raiva canina. [Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo;1976.

Gigante CM, Dettinger L, Powell JW, Seiders M, Condori REC, Griesser R, Okogi K, Carlos M, Pesko K, Breckenridge M, Simon EMM, Chu MYJV, Davis AD, Brunt SJ, Orciari L, Yager P, Carson WC, Hartloge C, Saliki JT, Sanchez S, Deldari M, Hsieh K, Wadhwa A, Wilkins K, Peredo VY, Rabideau P, Gruhn N, Cadet R, Isloor S, Nath SS, Joseph T, Gao J, Wallace R, Reynolds M, Olson VA, Li Y. Multi-site evaluation of the In34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR assay for post-mortem rabies diagnostics. *PLoS One* 2018; 13(5): e0197074.

Goldwasser RA, Kissling RE. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies vaccine antigens. *Experimental Biology and Medicine* 1958; 98: 219-223.

Guarino H, Castilho JG, Souto J, Oliveira R de N, Carrieri ML, Kotait I. Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Uruguay. *Virus research* 2013; 173(2):415–20.

Hanlon CA, Kuzmin IV, Blanton JD, Weldon WC, Manangan JS, Rupprecht, CE. Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. *Virus Research* 2005; 111: 44-54.

Hanlon CA, Nadin-Davis SA. Laboratory diagnosis of rabies: Laboratory-Based Rabies Diagnostic Testing. In: Jackson AC. *Rabies*. Third Edition. Canada: Elsevier, 2013. p. 409-459.

Hayman DT, Banyard AC, Wakeley PR, Harkess G, Marston D, Wood JL, Cunningham AA, Fooks AR. A universal real-time assay for the detection of Lyssaviruses. *Journal of Virological Methods* 2011; 177: 87-93.

Hughes GJ, Smith JS, Hanlon CA, Rupprecht CE. Evaluation of a TaqMan PCR assay to detect rabies virus RNA: influence of sequence variation and application to quantification of viral loads. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42: 299-306.

Instituto Pasteur. Secretaria de Estado da Saúde. Governo do Estado de São Paulo. Diagnóstico de Raiva animal [Internet]. 2019 [acesso em 20 de junho 2019]. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/instituto-pasteur>.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) - 2019. *Virus Taxonomy*, 2019. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org>> Acesso em:01/07/2019.

Jackson AC, Ye H, Phelan CC, Ridaura-Sanz C, Zheng Q, Li Z, Wan X, Lopez-Corella E. Extraneural organs involvement in human rabies. Laboratory Investigation 1999; 79:945-951.

Jackson AC. Rabies. Canadian journal neurology science 2000; 27: 278-82.

Jackson AC. Rabies Scientific basis of the disease and its management. 3^a ed Academic Press 2013; 2: 17 a 60.

Kanitz FA, Cargnelutti JF, Weiblen R, Batista HBCR, Flores EF. Virus isolation in cell culture for confirmatory diagnostic of rabies in bovine specimens. Ciência Rural 2015; 45: 2193-2196.

Kawamura T. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica, eficiência de um teste. Arquivos Brasileira de Cardiologia 2002; 79 (4):437-41.

Kimura LMS, Dantas Junior JV, Moura WC, Kotait I, Marin VA, Brandao PE. Reação em cadeia da polimerase como recurso ao diagnóstico da raiva. Revista Brasileira de Medicina Veterinária 2006; 28: 104-109.

King AA. Cell culture of rabies virus. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory Techniques. In Rabies 1996. Geneva: World Health Organization. p. 114-130.

Kissi B, Tordo N, Bourhy H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. Virology 1995; 209: 526-37.

Klebe RJ, Ruddle FH Neuroblastoma: Análise de cultura celular de um sistema de células-tronco diferenciadoras. Journal of Cell Biology 1969; 43: 69A.

Kobayashi Y, Sato G, Shoji Y, Sato T, Itou T, Cunha EM, Samara SI, Carvalho AA, Nociti DP, Ito FH, Sakai T. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. Journal of Veterinary Medical Science 2005; 67(7): 647-652.

Kobayashi Y, Inoue N, Sato G, Itou T, Santos HP, Brito CJ, Gomes AA, Santos MF, Silva MV, Mota CS, Ito FH, Sakai T. Phylogenetic characterization of rabies virus isolates from Carnivora in Brazil. The Journal of Veterinary Medical Science 2007; 69(7): 691-696.

Kobayashi Y, Sugimoto K, Mochizuki N, Segawa T, Itou T, Carvalho AAB, Nociti DP, Mello RM, Santos AKRA, Ito FH, Sakai T. Isolation of a phylogenetically distinct rabies virus from a tufted capuchin monkey (*Cebus apella*) in Brazil. Virus Research 2013; 178: 535-538.

Koprowski H. The mouse inoculation test. In: Meslin F-X, Kaplan M.M., Laboratories Techniques in Rabies. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996.p. 80-87.

Kotait I, Favoretto SR, Carrieri ML, Takaoka N. Raiva Humana causada pela variante 3 - *Desmodus rotundus* - no Estado de São Paulo. In: Seminário Internacional Morcegos como transmissores da Raiva; 2001; São Paulo. Seminário Internacional Morcegos como transmissores da Raiva - Programa e Resumos; 2001. p. 70-71.

Kotait I, Carrieri ML, Carnieli PJR, Castilho JG, Oliveira RN, Macedo CI, Scheffer KC, Achkar SM, Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. Boletim Epidemiológico Paulista 2007; 40: 2-8.

Kotait I, Carrieri ML. Raiva. In: Trabulsi. Microbiologia. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 689-98.

Kotait I, Carrieri ML, Takaoka NY. Raiva - Aspectos gerais e clínica. São Paulo: 2009. p. 1- 48. (Manual técnico do Instituto Pasteur).

Kotait I, Oliveira RN, Carrieri ML, Castilho JG, Macedo CI, Pereira PMC, Boere V, Montebello L, Rupprecht CE. Non-human primates as a reservoir for rabies virus in Brazil. Zoonoses Public Health 2019; 66 (1):47–59. <https://doi.org/10.1111/zph.12527>.

Krammer, H.C. Evaluating medical tests- objective and quantitative guidelines. Newbury Park: Sage Publications; 1992.

Lafon M, Wiktor TJ. Antigenic sites on the era rabies virus nucleoprotein and non-structural protein. Journal of Genetic Virology 1985; 66: 2125-2133.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 1977; 33:159-75.

Larghi OP, Nebel AE, Lazaro I, Savy VL. Sensitivity of BHK-21 cells supplemented with diethylamino ethyl-dextran for detection of street rabies virus in saliva samples. Journal of Clinical Microbiology 1975; 1: 243-245.

La Rosa I, Prestera NE, Díaz Pérez PM, Panozo R, Caraballo DA, Tealdo MS, Beltrán FJ, Gury Dohmen FE. Rabies variants circulating in Argentina isolated in neuroblastoma cells. In: Anais da XXIX Rabies in the Americas; 2018 Buenos Aires, Argentina; 2018.

Lembo T, Niezgoda M, Velasco-Villa A, Cleaveland S, Ernest E, Rupprecht CE. Evaluation of a direct, rapid immuno-histochemical test for rabies diagnosis. Emerging Infectious Diseases 2006; 12(2): 310-13.

Lépine P. Laboratory techniques in rabies: Fermi-type vaccine. Monograph series World Health Organ. 1973;(23):199-200.

Lépine P, Atanasiu P. Production of antirabies serum of animal origin. Monograph series World Health Organ. 1973;(23):299-303.

Levaditi MC. Virus rabique et culture des cellules in vitro. Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales 1913; 75: 505.

Liebermann H. Infecções por rhabdovírus. In: Beer, J. Doenças infecciosas em animais domésticos. São Paulo: Roca 1988; 167-182.

Lucca T, Rodrigues RCA, Nitsche A, Von Zuben APB. Ações de vigilância e controle da Raiva frente ao caso positivo em felino no município de Campinas, São Paulo, Brasil. Boletim Epidemiológico Paulista 2017; (162): 33-41.

Lyles DS, Rupprecht CE. Rhabdoviridae. In: Knipe DM, Howley PM, (Eds.) Fields Virology. 5 eds. Lippincott Williams & Wilkins 2007; 39: 1364-1408.

Macedo CI, Carnieli P Jr, Brandão PE, Travassos da Rosa ES, Oliveira RN, Castilho JG, Medeiros R, Machado RR, Oliveira RC, Carrieri ML, Kotait I. Diagnosis of Human Rabies Cases by Polymerase Chain Reactin of Neck-Skin Samples. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2006; 10(5): 341-5.

Madhusudana SN, Sundaramoorthy S, Ullas PT. Utility of human embryonic kidney cell line HEK-293 for rapid isolation of fixed and street rabies viruses: comparison with Neuro-2a and BHK-21 cell lines. International Journal of Infectious Diseases 2010; 14(12): e1067-71.

Madhusudana SN, Subha S, Thankappan U, Ashwin YB. Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test (DRIT) for rapid diagnosis of rabies in animals and humans. Virologica Sinica 2012; 27 (5): 299-302.

Mani R S, Madhusudana S N, Mahadevan A, Reddy V, Belludi A Y, Shankar S K, Utility of real-time taqman pcr for antemortem and postmortem diagnosis of human rabies. Journal of Medical Virology 2014; 86 (10): 1804-1812.

Mani RS, Anand AM, Madhusudana SN. Human rabies in India: an audit from a rabies diagnostic laboratory. Tropical Medicine & International Health 2016; 21(4):556-63. doi: 10.1111/tmi.12669.

McElhinney LM, Marstona DA, Brookes SM, Fooks AR. Effects of carcass decomposition on rabies virus infectivity and detection. Journal of Virological Methods 2014; 110-113.

Mebatsion T. Extensive attenuation of rabies virus by simultaneously modifying the dynein light chain binding site in the p protein and replacing arg333 in the g protein. Journal of Virology 2001; 75(23): 11496-11502.

Menzio BD, de Novaes Oliveira R, Paiz LM, Richini Pereira VB, Langoni H. Antigenic and genotypic characterization of rabies virus isolated from bats (Mammalia: Chiroptera) from municipalities in São Paulo State, Southeastern Brazil. *Archives of Virology* 2017;162(5):1201-1209.

Meslin F-X, Kaplan MM. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. *Laboratory Techniques in Rabies*. 1996. Geneva: World Health Organization. p. 9-27.

Middel K, Fehlner-Gardiner C, Pulham N, Buchanan T. Incorporating Direct Rapid Immunohistochemical Testing into Large-Scale Wildlife Rabies Surveillance. *Tropical medicine and Infectious Diseases* 2017; 30;2(3): e21.

MS-Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva. ed. Ministério da Saúde; Brasília: Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde / Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2008. 108p.: il. – (série a. normas e manuais técnicos).

Nadin-Davis SA. Polymerase chain reaction protocols for rabies virus discrimination. *Journal of Virological Methods* 1998; 75: 1-8.

Nadin-Davis SA, Abdel-Malik M, Armstrong J, Wandeler AI. Lyssavirus P gene characterization provides insights into the phylogeny of the genus and identifies structural similarities and diversity within the encoded phosphoprotein. *Virology* 2002; 298: 286–305.

Nadin-Davis SA, Sheen M, Wandeler A. Development of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction methods for human rabies diagnosis. *Journal of medical virology* 2009; 81(8): 1484-1497.

Nagaraj T, Vasanth JP, Desai A, Kamat A, Madhusudana SN, Ravi, V. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. *Journal of Clinical Virology* 2006; 36(1): 17-23.

Nikolic J, Lagaudrière-Gesbert C, Scrima N, Blondel D, Gaudin Y. Structure and Function of Negri Bodies. *Physical Virology, Advances in Experimental Medicine and Biology* 2019; 1140(6): 111-127.

Nogueira, Y.L. Estimativa de validade de um novo método de isolamento de vírus rábico. *Revista Saúde Pública* 2004; 2(38): 315-322.

OIE-World Organization for Animal Health. Rabies portal, 2014. available at: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/rabies-portal//>, (accessed on 26 august 2015).

Oliveira RN, Takaoka NY, Brandão PE, Carnieli JR P, Macedo CI, Castilho JG, Carrieri ML, Kotait I. Postmortem Confirmation of Human Rabies Source. *Emerging Infectious Diseases* 2006; 12 (5): 867-869.

Oliveira RN, De Souza SP, Lobo RS, Castilho JG, Macedo CI, Carnieli P, Carnieli P Jr, Fahl WO, Achkar SM, Scheffer KC, Kotait I, Carrieri ML, Brandão PE. Rabies virus in insectivorous bats: implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. *Virology* 2010; 405(2): 352 -60.

OMS- World Health Organisation/ Organização Mundial da Saúde, available at: <http://saude.gov.br/component/tags/tag/oms> , 2018.

OPAS-Pan American Health/ Organização Pan-Americana da Saúde Organization. Biosafety in health: priorities and strategies of action. OPAS; 2001.

Peixoto ZMP, Cunha EMS, Sacramento DRV, Souza MCAM, Da Silva LHQ, Germano PL, Kroeffer, SS, Kotait I. Rabies Laboratory Diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. *Brazilian Journal of Microbiology* 2000; 31(1): 72-75.

Power AG, Mitchell CE. Pathogen spillover in disease epidemics. *The American Society of Naturalists. The American Naturalist* 2004; 164(5): S79-89.

Pieri KMS. Caracterização de amostras de vírus da raiva isoladas no Estado de Santa Catarina através de anticorpos monoclonais e PCR de baixa estríngência. [Dissertação]. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa-Biotecnologia; 2003.

Pouliott C, Dupuis M, Applier K, Brunt S, Rudd R, Davis A. Susceptibility of neuroblastoma cells to rabies virus may be affected by passage number. *Journal of Virological Methods* 2017 ;247: 28-31.

Robardet E, Picart-Meyer E, Andrieu S, Servat A, Cliquet F, International interlaboratory trials on rabies diagnosis an overview of results and variation in reference diagnosis techniques (fluorescent antibody test, rabies tissue culture infection test, mouse inoculation test) and molecular biology techniques. *Journal of Virological Methods* 2011; 177: 15-25.

Rosen GA. History of Public Health- revised expanded edition New York: M.D. Publications, Inc., 1958; 3(4): 551- E. Ashworth Underwood.

Rudd RJ & Trimarchi CV. Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus. *Journal of Clinical Microbiology* 1987; 25: 1456-1458.

Rudd RJ & Trimarchi CV. Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1989; 27: 2522-28.

Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachuda T. Rabies re-examined. *Lancet Infectious Diseases* 2002; 2(6): 327–343.

Rupprecht CE. A tale of two words: public health management decisions in human rabies prevention. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 39(2): 281-3.

Rupprecht C & Nagarajan T. Direct fluorescent antibody test for rabies diagnosis. *Current laboratory techniques in rabies, research and prevention* 2014; 2(8): 83-93.

Rupprecht CE, Fooks AR, Abela-Ridder B. *Laboratory Techniques in Rabies*. 2018; 5(5): 43-52.

Sasikalaveni A, Tirumurugaan KG, Manoharan S, Dhinakar Raj G, Kumanan K. Co-culture: A quick approach for isolation of street rabies virus in murine neuroblastoma cells. *Veterinary World* 2015; 8(5): 636-639.

Silva RA, SilvaNM, Menezes PRV. Ocorrência do vírus da raiva na medula e no bulbo de equinos na doença natural e sua ausência nas diferentes regiões do sistema nervoso central e outros tecidos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 1974; 9(7): 29-31.

Silva M, Riet-Correa f, Galiza GJ, Azevedo SS, Afonso JA, Gomes AA. Distribuição do vírus rábico no sistema nervoso central em ruminantes naturalmente infectados. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2010; 30(11): 940-944.

Smith AL, Tignor GH, Mifini K, Motohaski T. Isolation and assay of rabies sero group viruses in cer cells. *Intervirology* 1977; 8: 92-99.

Smith AL, Tignor GH, Emmons RW, Woodie JD. Isolation of field rabies virus strains in cer and murine neuroblastoma cell cultures. *Intervirology* 1978; 9: 359-361.

Smith JS, Fishbein DB, Rupprecht CE, Clark K. Unexplained rabies in three immigrants in the united states: a virologic investigation. *New England Journal of Medicine* 1991; 324:205–11.

Singh R, Singh KP, Cherian S, Saminathan M, Kapoor S, Manjunatha Reddy GB, Panda S, Dhama K. Rabies – epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly* 2017; 37(1): 212–251.

Souza TCP, Estudo da distribuição do vírus da raiva (RABV) em amostras de sistema nervoso central e glândulas salivares de equinos naturalmente infectados. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2019.

Steele JH. History of rabies. In: Baer GM. The natural history of rabies. New York: Academic Press. 1975; 1-28.

Steele JH, Fernandez PJ. History of rabies and global aspects. In: Baer GM. The natural history of rabies. 2 ed. Boston: CRC Press. p.1-26, 1991.

SVS/MS–Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, 2008. <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>.

SVS/MS–secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, 2019. <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>.

Takaoka NY. Alteração no perfil epidemiológico da Raiva no Estado de São Paulo. In: Anais do I Seminário Internacional de Raiva: 2000. 22-24 agosto. Instituto Pasteur. São Paulo; 2000; pp 23–24.

Takaoka NY, Raiva humana no estado de São Paulo. In: Anais do Seminário Internacional de Raiva: 2003. 5-7 agosto. Instituto Pasteur. São Paulo; 2003.

Tierkel ES. Rapid microscopic examination for Negri bodies and preparation of specimens for biological test. In: Laboratory techniques in Rabies third ed. World Health Organization, Geneva, 1973; p.41-55.

Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? Proceedings of the National Academy of Sciences 1986; 83(11):3914-8.

Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the l (polymerase) proteins of unsegmented negative-stand RNA-viruses. Virology 1988; 165: 565-576.

Tordo N, Kouknetzoff A. The rabies virus genome: An Overview. Onderstepoort. Journal of Veterinary/ Research 1993; 60: 263-269.

Tordo N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: Meslin F-X, Kaplan M.M., Koprowski H. Laboratory Techniques in Rabies. Geneva: World Health Organization. 1996; 28-51.

Trimarchi CV, Smith JS. Diagnostic Evaluation. In: Jackson A.C., Wunner W.H. Rabies. San Diego, USA. 2002; p.308-349.

Trimarchi CV, Nadin-Davis SA. Diagnostic Evaluation. In: Jackson A.C., Wunner W.H. Rabies. San Diego, USA. 2ed. 2007; p.411-462.

Umoh JU, Blenden DC. Comparison of primary skunk brain and kidney and raccoon kidney cells with established cell lines for isolation and propagation of street rabies virus. *Infection and Immunity* 1983; 41: 1370-1372.

Versteeg J. A colour atlas of virology. Netherlands. Wolfe Medical Publications Ltd, 1985; p.240.

Villasenõr JV. Epidemiologia de la rabia en México. *Salud Pública de México* 1974; 16(3):407-418.

Wacharapluesadee S, Sutipanya J, Damrongwatanapokin S, Phumesin P, Chamnanpood P, Leowijuk C, Hemachudha T, Supaporn. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. *Journal of Virological Methods* 2008; 151(2): 317-320.

Wada MY, Rocha SM, Maia-Elkhoury ANS. Situação da raiva no Brasil, 2000 a 2009. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 2011; 20(4): 509-518.

Wadhawa A, Wilkins K, Gao J, Condori R E, Gigante C M, Zhao H, Max, Ellinson J A, Greenberg L, Velasco Villa A, Orciari L, LI Y. A pan-lyssavirus TaqMan Real-Time RT-PCR assay for the detection of highly variable rabies virus and other lyssaviruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2017; 11(1): e0005258.

Wakeley PR, Johnson N, Mcelhinney LM, Marston D, Sawyer J, FookS AR. Development of a Real-Time, TaqMan Reverse Transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(6): 2786-2792.

Webster IT, Dawson JR. Diagnostic and protection tests for rabies.; from the Laboratories of the Rockefeller Institute for Medical Research. New York City.1935.

Webster WA. A tissue-culture infection test in routine rabies diagnosis. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1987; 87: 113-16.

Webster WA & Casey GA. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: Meslin F-X, Kaplan M.M., Koprowski H. *Laboratory Techniques in Rabies* 1996. Geneva: World Health Organization. 1996; p. 96-104.

Whelan SP, Wertz GW. Regulation of RNA synthesis by the genomic termini of vesicular stomatitis virus: identification of distinct sequences essential for transcription but not replication. *Journal of Virology*. 1999; 73(1): 297-306.

Wertz GW, Davis NL, Patton J. The role of proteins in vesicular stomatitis virus RNA replication. In: Wagner RR *The Rhabdoviruses*. New York: Plenum, 1987, p 271- 296.

Wilkinson GS, Social organization and behavior. In: Greenhall AM, Schmidt, U. Natural history of vampire bats. Florida: 1988; p.85-97.

Wilkinson L, History of Rabies. In: Jackson AC e Wunner H (Ed.). Rabies. New York, Academic Press. 2002; p. 1-22.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Expert consultation on rabies. 1° report (technical report series, 931). 2004. world health organization, Geneva, 2004.

WHO. World Health Organization. Geneva: WHO. Rabies [Internet]. 2018a [acesso em 20 Out 2018]. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Laboratory techniques in rabies-fifth edition. The role of diagnostics in surveillance. 2018b; v. 4 p. 35-42.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Laboratory techniques in rabies-fifth edition-An overview of ante mortem and post mortem tests for diagnosis of human rabies 2018c; v. 5 p. 43-54.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Laboratory techniques in rabies-fifth edition The direct fluorescent antibody test. 2018d; v.8 p.108-123.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Zero by 30: the global strategic plan to end human deaths from dog-mediated rabies by 2030, 2018e.

Wunner WH, Dietzschold B, Smith CL, Lafon M, Golub E. Antigenic variants of cvs rabies virus with altered glycosylation sites. Virology 1985; 140:1-12.

Wunner WH. The chemical composition and molecular struture of rabies viruses. In: Baer GM. The natural history of rabies. Boca Raton: CRC Press 1991; 31-67.

Wunner WH. Rabies Virus. In: Rabies. Jackson AC, Wunner WH (Eds.). San Diego: Academic Press 2002; 23-111.

Wunner WH, Rabies. In: Rabies. Jackson AC, Wunner WH (Eds). San Diego: Academic Press. 2007; 23-68.

Yang DK, Shin EK, OhYI, Lee KW, Lee CS, Kim SY, Lee JA, Song JY. Comparison of four diagnostic methods for detecting rabies viruses circulating in Korea. Journal of Veterinary Science 2012; 13(1): 43-48.

Yelverton E, Norton S, Obijeski JF, Goeddel DV. Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in Escherichia coli. Science 1983; 219(4585): 614-620.

Yung PV, Lagos BJ, Lineros SM, Fernández OJ. Diagnóstico e identificación de variantes de virus rábico en Chile. In: XXIX Rabies in the Americas - Buenos Aires, Argentina - 28th. October- November 1st.; 2018.

Xavier SM. Comparação dos métodos de inoculação intracerebral em camundongos (*Mus musculus*) e de inoculação em cultura de células BHK-21 (C13) no diagnóstico da Raiva. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

8. ANEXO

8.1 APROVAÇÃO CEUA



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO PASTEUR
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



São Paulo, 08 de fevereiro de 2018.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Estudo comparativo entre as técnicas de imunofluorescência direta, isolamento viral em camundongos e isolamento viral em cultivo celular usadas no diagnóstico da raiva**", registrado com o número 03.2018, sob a responsabilidade da pesquisadora científica Dra. Juliana Galera Castilho Kawai, foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto Pasteur (CEUA-IP) em reunião de 06/02/2018.

Assinatura manuscrita de Karen Miyuki Asano.

Karen Miyuki Asano
Coordenadora CEUA-IP
Biênio 2016 - 2017

8.2. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DA RAIVA UTILIZADAS NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO IP AVALIADAS NESSE ESTUDO

8.2.1 Imunofluorescência direta (IFD)

Todas as amostras foram submetidas a técnica de IFD adaptada de Dean et al. (1996).

Para a realização da IFD foram obtidas impressões de fragmentos de SNC das amostras em lâminas de microscopia, sendo fixadas posteriormente por imersão em acetona P.A. a -20°C por 45 min. Após fixação, as lâminas foram removidas da acetona e após a secagem foram incubadas com 25uL de anticorpos policlonais fluorescentes (imunoglobulinas anti RABV marcadas com isotiocianato de fluoresceína, também chamado de conjugado para Raiva), previamente titulado, durante 30 min. a 37°C. O anticorpo anti ribonucleoproteína foi produzido no Instituto Pasteur-SP, conforme descrito por Caporale et al (2005).

Após esse período, foi realizada uma primeira lavagem das lâminas em solução salina tamponada (PBS) pH 7,5 e, então, as mesmas permaneceram imersas em PBS durante 5 min., repetindo-se este procedimento por duas vezes. Em seguida as lâminas foram submetidas a lavagem com água destilada e permaneceram imersas durante 5 min., repetindo-se este procedimento por duas vezes. As lâminas após secagem foram montadas com glicerina tamponada pH 8,5, cobrindo-se com lamínula. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência (Zeiss®, Alemanha) com objetiva de 40x.

As impressões positivas foram confirmadas pela visualização de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (corpúsculos de Negri) característicos, brilhantes de cor esverdeada, de diferentes formas e tamanhos (Figura 9A). As impressões negativas foram confirmadas pela ausência de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (Figura 9B).

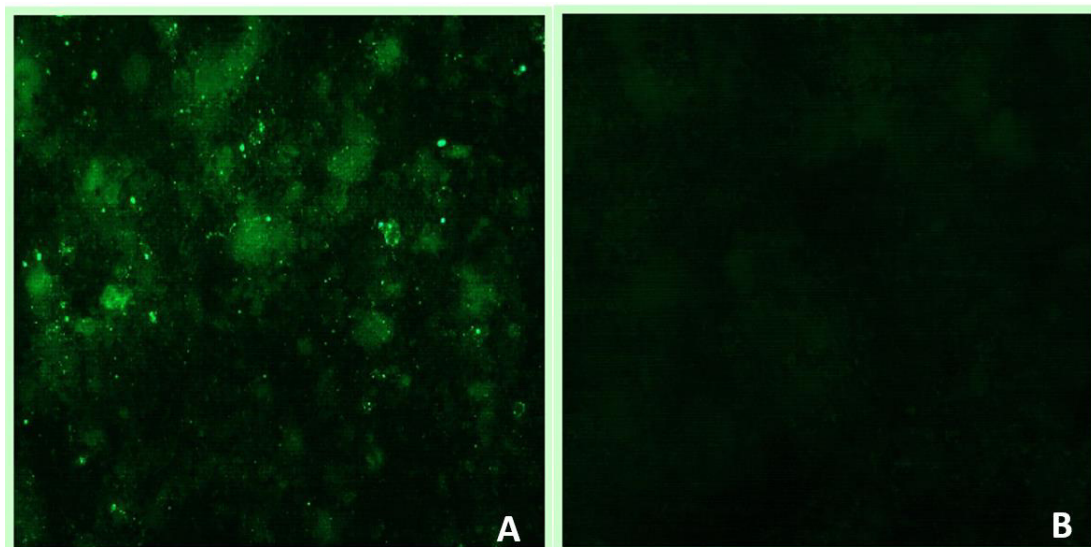


Figura 9: A) Impressão do Sistema Nervoso Central (SNC) de cão positivo submetidos à técnica de imunofluorescência direta (IFD). B) Impressão do SNC de cão negativo submetidos à técnica de IFD. Fonte: Caporale (2005).

8.2.2. Isolamento viral em camundongo (IVC)

Todas amostras foram submetidas à técnica de IVC, realizadas por inoculação intracerebral em camundongos conforme protocolo descrito por Koprowski (1996).

Para o emprego da técnica de IVC foi utilizada a linhagem *Swiss Webster*, com idade de 21 dias, e com peso de 11 a 14 g. Para cada amostra foi utilizado um grupo de seis camundongos. Foi preparada uma suspensão viral a 20% (peso/volume – em diluente contendo 1mL de gentamicina Sigma®, 20mL de Soro Fetal Bovino Gibco® e 800mL de solução fisiológica 0,85%) a partir de SNC de cada amostra. A suspensão foi centrifugada a 3000 x rpm por 30 minutos, e o sobrenadante separado e inoculado nos camundongos por via intracerebral utilizando seringa de 1mL, aplicando um volume de 0,03mL. Os camundongos foram alojados em caixas de polipropileno identificadas, mantidas em estante ventilada (Alesco®, Brasil), com água e ração *ad libitum*. Foram utilizadas fichas de avaliação individual para o registro de alterações clínicas, com observação diária dos camundongos (por 21 dias quando inoculadas suspensão de SNC de cães e gatos, e 30 dias para material inoculado de outras espécies animais), a

procura de sinais clínicos característicos da Raiva. Ao apresentarem os sinais clínicos da doença (Figura 10A), os camundongos foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂, procedendo-se a retirada do encéfalo e submetendo-o ao teste de IFD (Figura 10B), conforme descrita acima, para a confirmação diagnóstica. A técnica constitui, portanto, o isolamento *in vivo* do RABV.

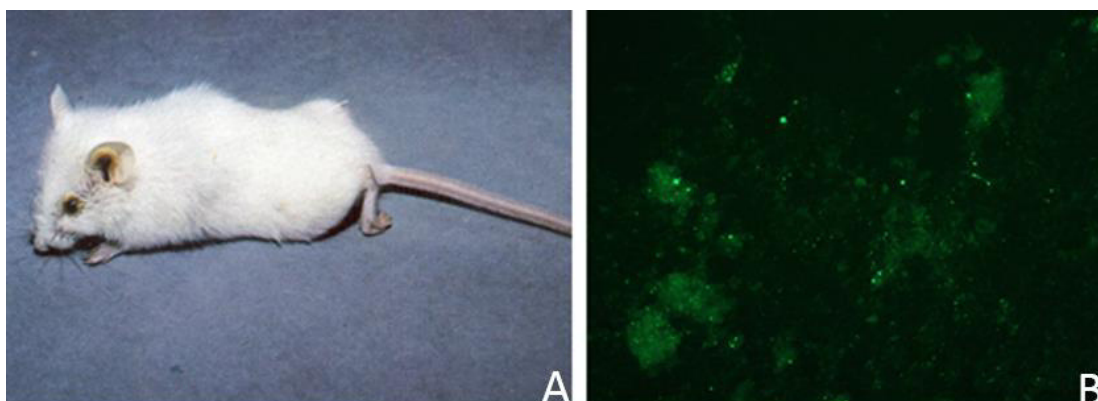


Figura 10: A) Camundongo da linhagem *Swiss Webster* infectado utilizando a técnica de isolamento viral em camundongo (IVC), com sintomatologia clínica condizente a Raiva (paralisia dos membros inferiores e pelos eriçados); B) Impressão de cérebro de camundongo infectado com o vírus da raiva submetidos à técnica de imunofluorescência direta (IFD) para confirmação do IVC .

Fonte: (A): Versteeg, 1985.; (B): Instituto Pasteur.

8.2.3. Isolamento viral em cultivo celular (IVCC)

Todas as amostras foram submetidas à técnica de IVCC, conforme protocolo descrito por Webster & Casey (1996) modificado por Castilho et al. (2007).

As alíquotas de suspensão preparadas a 20% (peso/volume – em diluente contendo 1mL de gentamicina Sigma®, 20mL de Soro Fetal Bovino Gibco® e 800mL de solução fisiológica 0,85%) a partir de SNC de cada amostra foram inoculadas em célula de neuroblastoma de camundongo (Neuro-2a CC1-131, ATCC) utilizando o sistema de placas de 96 orifícios. Em cada cavidade da placa foram inoculados 40 µL de amostra (suspensão a 20%), 160µL de *Minimum Essential Medium* (MEM) Sigma®, preparado previamente com 10% de SFB e acrescidos de 30µL de aminoácidos não essenciais e gentamicina em cada 10mL de MEM e 100µL da suspensão das

células Neuro-2a (5×10^5 células/ml). As suspensões foram inoculadas em triplicata nas placas e foram utilizados controles positivos: *Challenge Virus Standard* (CVS) e controles negativos (amostra sabidamente negativa ou a própria célula); para garantir a qualidade interna do procedimento. As placas foram incubadas a 37°C, em estufa com 5% de CO₂ por um período de 96 horas. Após esse tempo, o meio foi removido com uma bomba de vácuo e as células aderidas a cada orifício das placas foram fixadas com 200µL de acetona a 80%, durante 15 min., a 4°C. Em seguida, as monocamadas celulares foram submetidas a uma reação de IFD, como descrito por Dean et al. (1996) utilizando 40µL do anticorpo anti RABV previamente titulado combinado com Azul de Evans. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C durante 1 hora, e após esse tempo as placas foram lavadas três vezes em tampão fosfato salina (pH 7,4) e em água destilada. Logo após a secagem das placas, foram acrescidos 50µL de glicerina a 10% por cavidade. As placas contendo células foram examinadas em microscópio invertido de fluorescência (Leica Microsystems® Alemanha), em aumento de 200x.

A amostra foi considerada positiva quando apresentou uma ou mais células infectadas (fluorescência específica) (Figura 11A). A amostra foi considerada negativa quando não apresentou células com a fluorescência específica (Figura 11B).

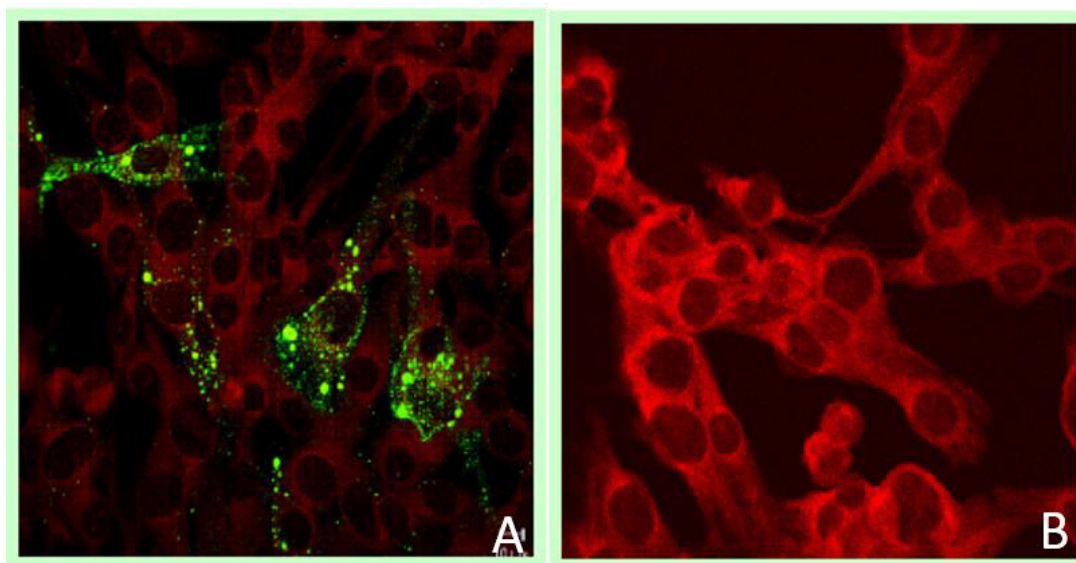


Figura 11: A) Células Neuro-2a infectadas com vírus da raiva por meio da técnica de isolamento viral em cultivo de célula (IVCC); B) Células Neuro-2a não infectada, controle negativo.
Fonte: Caporale (2005).