

**SHEILA DE MATOS XAVIER**

**COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE INOCULAÇÃO  
INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGOS (*Mus musculus*) E DE  
INOCULAÇÃO EM CULTURA DE CÉLULAS BHK-21 (C13), NO  
DIAGNÓSTICO DA RAIVA.**

**PPGVS/INCQS**

**FIOCRUZ**

**2005**

**COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL EM  
CAMUNDONGOS (*Mus musculus*) E DE INOCULAÇÃO EM CULTURA DE CÉLULAS  
BHK-21 (C13), NO DIAGNÓSTICO DA RAIVA.**

**Sheila de Matos Xavier**

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária.  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.  
Fundação Oswaldo Cruz.

Orientador: CLÁUDIO DE MORAES ANDRADE

Rio de Janeiro

2005

COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE INOCULAÇÃO  
INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGOS (*Mus musculus*) E DE INOCULAÇÃO  
EM CULTURA DE CÉLULAS BHK-21 (C13), NO DIAGNÓSTICO DA RAIVA.

Sheila de Matos Xavier

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Prof. Dr. Cláudio de Moraes Andrade (Orientador)

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Teresinha Ferreira

---

Prof. Dr. Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos

---

Prof. Dr. Victor Augustus Marin

---

Rio de Janeiro

2005

## FICHA CATALOGRÁFICA

Xavier, Sheila de Matos

Comparação dos métodos de inoculação intracerebral em camundongos (*Mus musculus*) e de inoculação em cultura de células BHK-21 (C13), no diagnóstico da raiva. / Sheila de Matos Xavier. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2005.

xv, 84 p., 10 il., 4 tab.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária / INCQS, 2005. Orientador: Cláudio de Moraes Andrade.

1. Raiva 2. Diagnóstico laboratorial 3. Célula BHK-21 (C13) 4. Camundongo lactente.

I. Título.

A meus pais, meus avós e minha irmã – meu porto seguro.

*“Tudo é possível até que se prove impossível. E ainda assim o impossível pode sê-lo apenas por um momento”.*

Pearl S. Buck

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

A meus pais, meus avós e minha irmã, por estarem sempre junto de mim e pelo amor que nos une...

Aos meus amigos Fabíola da Cruz Nunes, Majia Carvalho Akiba e Fábio da Silva Souza, porque sobrevivemos ao tempo e à distância.

A meu orientador, Prof. Cláudio de Moraes Andrade, pela confiança, pelo carinho e pela amizade.

A Marlon Vicente da Silva, meu grande exemplo, com quem compartilho esta vitória, por tudo o que aprendi, pelo apoio incansável, pela dedicação diária à realização deste trabalho, pela paciência e, sobretudo, pela inestimável amizade.

A Wildeberg Cál Moreira e Beatriz Cristina Pereira dos Santos, pela torcida e enorme incentivo, por todos estes anos de amizade e por terem se tornado muito mais do que colegas de trabalho...

Às amigas Carla da Silva Mota e Rebeca Passos Wanderley, pelo apoio nos momentos difíceis, pela grande contribuição à realização deste trabalho, pela amizade e pelos momentos alegres dentro e fora do laboratório.

Aos funcionários da Seção de Diagnóstico de Raiva do IJV: Marcelo França da Silva, Bruno Leonardo de Freitas, Zenaide Neves e Mário de Aquino, por estarem sempre dispostos a ajudar e pela amizade.

Aos veterinários e funcionários do Setor de Biotério do IJV, pela colaboração.

A Wlamir Corrêa de Moura, pelo apoio e pela amizade.

Aos professores Teresinha Ferreira, Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos, Helenita Marques Torres, Márcio José de Figueiredo e Victor Augustus Marin, pela grande contribuição científica.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram, incentivaram e apoiaram este sonho.

À Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, à Direção e ao Centro de Estudos do Instituto Municipal de Medicina Veterinária "Jorge Vaitsman", pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação do PPGVS, à FIOCRUZ e à CAPES.

## RESUMO

A presente pesquisa teve por objetivo a comparação dos métodos de inoculação intracerebral em camundongo e inoculação em cultivo de células BHK-21 (C13) no diagnóstico da raiva, avaliando a sensibilidade e a especificidade destas técnicas, de forma a oferecer um resultado rápido e seguro. Foi realizada a titulação simultânea de 18 amostras de Sistema Nervoso Central de diferentes espécies animais, positivas para raiva, em células BHK-21 e camundongos lactentes e desmamados. Foram calculados os valores correspondentes a  $DICT_{50}$  (dose infecciosa em cultura de tecido 50%) para o cultivo celular,  $DP_{50}$  (dose positiva 50%) para camundongos lactentes, e  $DL_{50}$  (dose letal 50%) para camundongos desmamados. A capacidade de isolamento do vírus rábico e a comparação entre os títulos encontrados foram utilizadas na avaliação da sensibilidade dos sistemas testados. Para verificar a existência de correlação linear entre os valores de  $DICT_{50}$ ,  $DP_{50}$  e  $DL_{50}$ , obtidos em cada amostra, foi aplicado o teste de regressão linear simples. A avaliação da especificidade das técnicas *in vitro* e *in vivo*, foi verificada através da inoculação de 10 amostras negativas em células BHK-21 e camundongos lactentes. Foram encontrados valores de sensibilidade iguais a 100% para camundongos lactentes, 94,44% para camundongos desmamados e 88,89% para células BHK-21. Células BHK-21 e camundongos lactentes apresentaram valores de especificidade iguais a 100%. A aplicação da regressão linear simples mostrou que o coeficiente de correlação entre células BHK-21 e camundongos lactentes e desmamados não foi satisfatório. Dentre os métodos de isolamento de vírus rábico avaliados, a utilização de camundongos lactentes, sacrificados no sétimo dia pós-inoculação e submetidos à imunofluorescência direta, foi o que demonstrou melhor resultado, possibilitando a conclusão do diagnóstico em tempo hábil de permitir a alteração do tratamento profilático anti-rábico pós-exposição humano e auxiliar a vigilância epidemiológica da raiva.

**Palavras-chave:** Raiva. Diagnóstico laboratorial. Célula BKH-21 (C13). Camundongo lactente.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to make a comparison between the Mouse Inoculation Test (MIT) and Rabies Tissue Culture Infection Test (RTCIT) using BHK-21 (C13) cells, for rabies diagnosis, evaluating sensitivity and specificity of these techniques, in order to present a fast and secure result. A simultaneous titration of 18 rabies positive Central Nervous System samples from different animal species, was developed in BHK-21 cells and suckling and weaning mice. It was calculated the correspondent values of TCID<sub>50</sub> (Tissue Culture Infectious Dose 50%) for cell culture, PD<sub>50</sub> (Positive Dose 50%) for suckling mice and LD<sub>50</sub> (Lethal Dose 50%) for weaning mice. The competence for isolating rabies virus and the comparison among titres were used for evaluating rabies virus isolation systems sensitivity. To verify whether exists a linear correlation among TCID<sub>50</sub>, PD<sub>50</sub> and LD<sub>50</sub>, the Linear Correlation test was employed. Evaluation of specificity of the *in vitro* and *in vivo* techniques was established through inoculating 10 negative samples in BHK-21 cells and suckling mice. Sensitivity values found were 100% for suckling mice, 94,44% for weaning mice and 88,89% for BHK-21 cells. BHK-21 cells and suckling mice showed specificity values equal to 100%. Linear Correlation showed that the correlation coefficients between BHK-21 cells and suckling and weaning mice were not satisfactory. Among the rabies virus isolation systems evaluated, the use of suckling mice, sacrificed in the seventh day post inoculation and submitted to fluorescent antibody technique, showed the best result, making possible the conclusion of rabies diagnosis in time to not only allow human post exposure antirabies treatment modification, but also help rabies epidemiologic surveillance.

**Key words:** Rabies. Laboratory Diagnosis. BHK-21 (C13) cell. Suckling mouse.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS

ABLV	= “Australian Bat Lyssavirus”
AchR	= Receptor de acetilcolina
ANVISA	= Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	= “American Type Culture Collection”
BA	= Células de origem anfíbia
BHK-21 (C13)	= “Baby Hamster Kidney”, linhagem 21, clone 13
CB13	= Célula derivada de cérebro bovino
Célula L	= Fibroblasto de camundongo não transformado
CER	= “Chick embryo-related”
CO <sub>2</sub>	= Dióxido de carbono
CVS	= “Challenge Virus Standard”
DEAE-D	= Dietilaminoetil-Dextrano
DICT <sub>50</sub>	= Dose infecciosa em cultura de tecido 50%
DL <sub>50</sub>	= Dose letal 50%
DP <sub>50</sub>	= Dose positiva 50%
DUVV	= “Duvenhage Vírus”
EBLV	= “European Bat Lyssavirus”
ELISA	= “Enzyme-linked immunosorbent assay”
EPC	= “Epithelioma Papulosum Cyprini”
ERA	= “Evelyn Rokitniki Abelseth”
FMH	= Célula de peixe de água doce
FUNASA	= Fundação Nacional de Saúde
g	= Aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s <sup>2</sup> )
G-MEM	= “Glasgow Minimum Essential Medium”
HeLa	= Célula de carcinoma epitelioide de cérvix humana
HEP	= “High Egg Passage”
IFD	= Imunofluorescência Direta
IgG	= Imunoglobulina G
IC	= Inoculação intracerebral
IMR32	= Neuroblastoma humano
Kb	= Quilobase
kDa	= Quilodalton
LBV	= “Lagos Bat Virus”

mAb	= Anticorpo monoclonal
MOKV	= “Mokola Virus”
N2A	= Neuroblastoma murino, linhagem N2A
NA-C1300	= Neuroblastoma murino, sublinhagem NA, clone 1300
OIE	= “World Organization for Animal Health”
OMS	= Organização Mundial de Saúde
PBS	= Salina tamponada fosfatada
pH	= Potencial de hidrogênio
PI	= Pós-infecção
PV	= “Pasteur Virus”
RABV	= “Rabies Virus”
RDC	= Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	= Ácido ribonucléico
RNAm	= Ácido ribonucléico mensageiro
RPH67	= Célula de origem anfíbia
RREID	= “Rapid rabies enzyme immunodiagnostic”
RTG2	= Célula de truta
RT-PCR	= “Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction”
SAD	= “Street-Alabama-Dufferin”
SNC	= Sistema Nervoso Central
SNP	= Sistema Nervoso Periférico
SUS	= Sistema Único de Saúde
TICT	= Teste de inoculação em cultura de tecido
UI	= Unidades internacionais
VSV	= Vírus da Estomatite Vesicular
WCBV	= “West Caucasian Bat Virus”

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1:</b> Relação de 18 amostras positivas analisadas, e seus respectivos valores de $DICT_{50}$ em 48, 72 e 96 horas, $DP_{50}$ em 7 e 21 dias e $DL_{50}$ . .....	49
<b>Tabela 1:</b> Relação das 16 amostras onde foi possível o isolamento do vírus rábico em células BHK-21, com seus valores de $DICT_{50}$ , 48, 72 e 96 horas pós-inoculação .....	52
<b>Tabela 2:</b> Relação de 18 amostras onde foi possível o isolamento do vírus rábico, com seus respectivos valores de $DP_{50}$ , $DL_{50}$ , média das $DP_{50}$ , e a diferença entre a média das $DP_{50}$ e a $DL_{50}$ .....	53
<b>Tabela 3:</b> Relação das 18 amostras positivas, com seus respectivos valores de $DICT_{50}$ , $DP_{50}$ e $DL_{50}$ .....	55
<b>Tabela 4:</b> Relação de dez amostras negativas para raiva, inoculadas em células BHK-21 e camundongos lactentes .....	62

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 4:** Percentual acumulado de Positividade no Grupo I, positividade em células BHK-21, 96 horas pós-inoculação, e mortalidade no Grupo III, para 17 amostras inoculadas com as diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . ..... 56
- Figura 5:** Percentual acumulado de Positividade no Grupo II, positividade em células BHK-21, 96 horas pós-inoculação, e mortalidade no Grupo III, para 4 amostras inoculadas com as diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . ..... 59

## APÊNDICE

- Figura 1:** Teste de IFD em células BHK-21 infectadas com vírus rábico fixo PV. Objetiva 20x.
- Figura 2:** Placa de 96 poços contendo células BHK-21 inoculadas com amostra de vírus rábico de rua. Teste de IFD em tapete celular inoculado com a diluição  $10^{-1}$  (Reg. 364/05). Objetiva 20x.
- Figura 3:** Teste de IFD de células BHK-21 infectadas com vírus rábico de rua (Reg. 399/05). Objetiva 20x.

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Isolamento do vírus rábico e cálculo da $DICT_{50}/DP_{50}/DL_{50}$ em 18 amostras positivas para raiva. ....	50
<b>Gráfico 2:</b> Isolamento do vírus rábico e cálculo da $DICT_{50}$ , segundo intervalo de tempo, em 16 amostras positivas para raiva, em cultivo de células BHK-21. ....	51
<b>Gráfico 3:</b> Comparação entre $DICT_{50}$ e $DP_{50}$ de 12 amostras positivas para raiva. ....	60
<b>Gráfico 4:</b> Comparação entre $DICT_{50}$ e $DL_{50}$ de 13 amostras positivas para raiva. ....	61
<b>Gráfico 5:</b> Comparação entre $DP_{50}$ e $DL_{50}$ de 15 amostras positivas para raiva.....	61

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 RAIVA .....	1
<b>1.1.1. Histórico</b> .....	1
<b>1.1.2. Agente Etiológico</b> .....	2
1.1.2.1. Morfologia e características moleculares, físicas e químicas .....	4
1.1.2.2. Propriedades antigênicas das proteínas estruturais .....	5
1.1.2.3. Ciclo replicativo .....	6
<b>1.1.3. Patogenia</b> .....	9
<b>1.1.4. Sintomatologia</b> .....	12
<b>1.1.5. Epidemiologia</b> .....	13
<b>1.1.6. Tratamento profilático</b> .....	14
<b>1.1.7. Diagnóstico diferencial</b> .....	16
1.2. DIAGNÓSTICO DA RAIVA .....	16
<b>1.2.1. Métodos Diagnósticos</b> .....	17
1.2.1.1. Método histopatológico .....	17
1.2.1.2. Imunofluorescência Direta .....	18
1.2.1.3. Inoculação intracerebral em camundongos .....	20
1.2.1.4. Inoculação em cultura de células .....	22
<u>1.2.1.4.1 Cultivo celular</u> .....	30
1.2.1.5. <i>Rapid rabies enzyme immunodiagnostic</i> .....	33
1.2.1.6. Aglutinação em látex .....	33
1.2.1.7. Técnicas moleculares .....	34
<b>1.2.2. Diagnóstico <i>intra vitam</i> da raiva</b> .....	35
1.3. VIGILÂNCIA SANITÁRIA .....	36
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	38
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	39
3.1. VÍRUS FIXO .....	39
3.2. AMOSTRAS DE CAMPO .....	39
3.3. ANIMAIS DE LABORATÓRIO .....	40
3.4. CÉLULAS BHK-21 (C 13) .....	40
3.5. PREPARO DAS DILUIÇÕES .....	41
3.6. INOCULAÇÃO DAS CÉLULAS BHK-21 .....	42
<b>3.6.1. Amostras positivas</b> .....	42
<b>3.6.2. Amostras negativas</b> .....	43
3.7. INOCULAÇÃO DOS CAMUNDONGOS .....	43
3.8. IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA .....	44
<b>3.8.1. Conjugado anti-rábico</b> .....	44
<b>3.8.2. Imunofluorescência Direta em Cultivo Celular</b> .....	45
<b>3.8.3. Imunofluorescência Direta em Camundongos</b> .....	45
3.9. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E DA ESPECIFICIDADE .....	46

3.10. DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL <sub>50</sub> ), DOSE POSITIVA 50% (DP <sub>50</sub> ), E DOSE INFECCIOSA EM CULTURA DE TECIDO 50% (DICT <sub>50</sub> ) .....	46
3.11. ACOMPANHAMENTO DAS CÉLULAS BHK-21 INOCULADAS, APÓS 48, 72 E 96 HORAS .....	47
3.12. APLICAÇÃO DA REGRESSÃO LINEAR SIMPLES .....	47
<b>4. RESULTADOS</b> .....	48
4.1. VÍRUS FIXO .....	48
4.2. AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS .....	48
<b>4.2.1. Resultados em cultura de células BHK-21</b> .....	50
<b>4.2.2. Resultados nos Grupos I, II e III</b> .....	53
<b>4.2.3. Avaliação do isolamento em células BHK-21 e camundongos lactentes e desmamados, e suas respectivas DICT<sub>50</sub>, DP<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub></b> ....	54
<b>4.2.4. Correlação entre DP<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub> e DICT<sub>50</sub></b> .....	60
4.3. AMOSTRAS DE CAMPO NEGATIVAS .....	62
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	63
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	71
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	72
<b>8. APÊNDICE</b> .....	80

## 1. INTRODUÇÃO

Considerada uma das zoonoses mais temidas em todo o mundo, a raiva é uma doença infecciosa aguda e progressiva do Sistema Nervoso Central (SNC), causada por um *Lyssavirus*, à qual todos os mamíferos domésticos e selvagens são susceptíveis (JOHNSON, 1965).

Todos os animais de sangue quente podem ser infectados sob condições experimentais, porém apenas os mamíferos são hospedeiros naturais significantes. A história natural da doença indica que os principais hospedeiros do vírus pertencem às Ordens Carnivora e Chiroptera. Dentro da Ordem Carnivora, as principais Famílias envolvidas são Mustelidae (cangambá, furão), Viverridae (mangusto), Canidae (cão, lobo, raposa) e Procionidae (quati, mão-pelada) (MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001).

O laboratório cumpre importante função no controle e prevenção da raiva, pois de seu laudo muitas vezes depende tanto a decisão da necessidade de se instituir medidas para controlar um surto, quanto a decisão de se prosseguir ou não com um longo e doloroso tratamento (MESLIN & KAPLAN, 1996; TRIMARCHI & SMITH, 2002; BRASIL, 2002).

### 1.1. RAIVA

#### 1.1.1. Histórico

A raiva é conhecida na Europa e Ásia desde os tempos remotos e sua história tem sido associada, primariamente, à espécie canina (JOHNSON, 1965).

É descrita em cães e outros animais domésticos desde 500 a.C., e considerada uma doença fatal no homem desde 300 a.C. (SOUZA, 1994). Alusões às conseqüências de mordidas de cães “violentos” ou “loucos” foram

encontradas entre os primeiros escritos da Mesopotâmia e da Índia, há milhares de anos (RUPPRECHT, HANLON & HEMACHUDHA, 2002).

Os gregos chamavam a raiva de *Lyssa* ou *Lytta*, que significa “loucura”. A doença no homem foi descrita como hidrofobia, onde a pessoa doente é atormentada ao mesmo tempo pela sede e pela aversão à água (STEELE & FERNANDEZ, 1991).

Atribui-se a Democritus a primeira descrição da raiva canina, aproximadamente 500 anos a.C. (STEELE & FERNANDEZ, 1991). Celsus (100 d.C.) reconheceu a relação entre a hidrofobia no homem e a raiva nos animais e recomendou cauterização das feridas produzidas pela mordedura de cães raivosos (JOHNSON, 1965).

Antes do século XVIII, a raiva era reconhecida como uma doença de caninos selvagens, e os cães domésticos não representariam parte significativa na sua manutenção e disseminação. O primeiro relato de epidemia entre cães domésticos em centros urbanos ocorreu na Itália em 1708 (JOHNSON, 1965).

### **1.1.2. Agente etiológico**

O vírus da raiva pertence à Ordem Mononegavirales, Família Rhabdoviridae, Gênero *Lyssavirus* (KING & TURNER, 1993; WUNNER, 2002).

A Família Rhabdoviridae contém muitos patógenos de significância médica, veterinária e botânica. Os rbdovirus de importância animal incluem três Gêneros: *Lyssavirus*, *Ephemerovirus* e *Vesiculovirus* (MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001).

Atribuía-se a raiva a apenas uma amostra de vírus, até que métodos sorológicos, antigênicos e genéticos demonstraram a existência de pelo menos sete genótipos. Os lissavirus são uma coleção de vírus geneticamente relacionados, adaptados à replicação no SNC de mamíferos (RUPPRECHT, HANLON & HEMACHUDHA, 2002). O vírus rábico clássico (RABV - *Rabies Virus*) é o arquétipo do Gênero *Lyssavirus* (FOOKS, 2004).

Historicamente, a classificação das amostras era feita através do reconhecimento dos sítios antigênicos da glicoproteína (proteína G) via teste de neutralização do vírus (MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001).

Painéis de anticorpos monoclonais anti-nucleocapsídeo (mAbs), empregados em análises sorológicas, foram capazes de diferenciar os lyssavirus em quatro sorotipos distintos, conforme o quadro abaixo:

<b>SOROTIPO</b>	<b>AMOSTRAS</b>
1	RABV, ABLV ( <i>Australian Bat Lyssavirus</i> )
2	LBV ( <i>Lagos Bat Lyssavirus</i> )
3	MOKV ( <i>Mokola</i> )
4	DUVV ( <i>Duvenhage</i> ), EBLV-1 ( <i>European Bat Lyssavirus tipo 1</i> ), EBLV-2

Fonte: FOOKS, 2004.

Com a aquisição de técnicas de análise genética molecular, o gênero *Lyssavirus* foi diferenciado em sete amostras geneticamente divergentes:

<b>GENOTIPO</b>	<b>AMOSTRAS</b>
1	RABV
2	LBV
3	MOKV
4	DUVV
5	EBLV-1
6	EBLV-2
7	ABLV

Fonte: FOOKS, 2004.

Morcegos são responsáveis pela transmissão dos genótipos LBV, DUVV, EBLV-1, EBLV-2, ABLV e RABV, sendo que este último é também veiculado por outros mamíferos terrestres. O transmissor do genótipo 3 (MOKV) permanece indeterminado (WHO, 2005b).

Quatro novos vírus semelhantes ao da raiva foram recentemente isolados de morcegos na Eurásia, e estão sendo propostos como novos membros do Gênero *Lyssavirus*. São eles: vírus *Khujand*, isolado no norte do Tajiquistão, em 2001; vírus *Irkut*, isolado no leste da Sibéria, em 2002; vírus *West Caucasian Bat* (WCBV), isolado nas montanhas do Cáucaso, a 150 km da fronteira leste da Turquia, em 2002; e vírus *Aravan*, isolado no sudeste do Quirguistão, na Ásia Central, em 2003 (FOOKS, 2004; WHO, 2005b).

#### 1.1.2.1. Morfologia e características moleculares, físicas e químicas.

O vírus rábico apresenta-se normalmente com forma de projétil, com uma extremidade arredondada e outra plana, ou como partículas baciliformes com ambas as extremidades arredondadas (MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001). A partícula infecciosa do vírus rábico possui 130 a 200 nm de comprimento (média de 180nm) e diâmetro de 60 a 110 nm (média de 75 nm) (WUNNER, 1991). Partículas defectivas são similares ao virion em suas proteínas e composição lipídica, mas são menores (20 a 50% do comprimento do vírus infeccioso padrão), podendo ter o genoma diminuído em 50 a 80%, e não são infecciosas (MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001).

O genoma do vírus rábico é composto por uma fita simples, não-segmentada de RNA, com peso molecular de  $4,6 \times 10^6$  kDa, e polaridade negativa (KOPROWSKI, 1991), sendo responsável por 1 a 4 % do peso da partícula (11 a 15 Kb em tamanho) (MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001).

Os lissavirus, como outros rabdovirus, possuem a seguinte relação entre seus componentes principais: RNA (2-3%), proteína (67-74%), lipídio (20-26%) e carboidrato (3%) (WUNNER, 2002).

O nucleocapsídeo exibe simetria helicoidal e é envolvido por um envelope lipídico. A superfície externa do vírion é recoberta por espículas de aproximadamente 5 a 10 nm de comprimento e 3 nm de diâmetro, exceto pela extremidade plana. As espículas são compostas de trímeros de glicoproteína (MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001).

O vírus da raiva é sensível a solventes lipídicos, preparações iodadas, compostos de amônia quaternária, temperatura de pasteurização, luz ultravioleta, raios-X e agentes oxidantes, e seu ácido nucléico é prontamente inativado pela  $\beta$ -propiolactona. Outras propriedades relevantes são a resistência à dessecação, ao congelamento e descongelamento sucessivos e relativa estabilidade a valores de pH entre 5 e 10 (KAPLAN, 1996; MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001).

#### 1.1.2.2. Propriedades antigênicas das proteínas estruturais.

O genoma dos rhabdovirus codifica 5 proteínas estruturais, denominadas: G (glicoproteína), N (nucleoproteína), P ou NS (fosfoproteína), M (proteína de matriz), e L (proteína RNA polimerase dependente de RNA) (MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001).

A proteína G, que possui 505 aminoácidos, é o principal antígeno de superfície capaz de induzir e reagir com anticorpos neutralizantes do vírus, e está associada a atividades de receptor (MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001). Diferentes sítios antigênicos, cada um formado por um grupo de epítopos, já foram descritos na proteína G (NATHANSON & GONZALES-SCARANO, 1991). Esta é a mais estudada dentre as proteínas do vírus rábico, devido a suas propriedades imunogênicas e antigênicas (WUNNER, 1991). Já foram identificados na proteína G, determinantes antigênicos para linfócitos B e T. A maioria das vacinas anti-rábicas humanas e veterinárias é baseada nos aspectos funcionais desta proteína (MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001).

A nucleoproteína, segunda mais estudada (WUNNER, 1991), é o principal componente do nucleocapsídeo viral (MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001). Apesar de imunogênica, esta proteína provavelmente possui limitada importância relacionada à proteção (NATHANSON & GONZALES-SCARANO, 1991). A proteína N é o principal alvo dos linfócitos T-*helper*, com reação cruzada entre os lissavirus (MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001). Fragmentos peptídicos desta proteína, produzidos por clivagem química ou enzimática, com o objetivo de definir e localizar os epítopos que ligam anticorpos

e reagem com linfócitos T, têm sido particularmente úteis para sua caracterização estrutural e imunológica (WUNNER, 1991).

A proteína P ou NS é constituinte do nucleocapsídeo viral e é formada por 297 a 303 aminoácidos. É uma proteína fosforilada, mas os sítios de fosforilação ainda não foram precisamente determinados (MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001).

A proteína M, anteriormente denominada M2 (WHO, 2005b), une o envelope viral ao nucleocapsídeo, sendo a menor e mais simples das proteínas do vírus rábico, com 202 aminoácidos. Uma função primária desta proteína envolve a interação do domínio citoplasmático da proteína G com o nucleocapsídeo (proteína N) durante a montagem e brotamento do vírus (MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001).

A proteína L é a maior e mais recentemente caracterizada proteína do vírus rábico, contendo entre 2.127 e 2.142 aminoácidos. É uma proteína multifuncional, e suas funções incluem a síntese de RNA, terminação, metilação e poliadenilação de RNA viral, mas pelo fato de estar presente em pequenas quantidades, esta é uma das proteínas virais menos estudadas (MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001; WUNNER, 1991).

#### 1.1.2.3. Ciclo replicativo

A seqüência de eventos que acontece na replicação *in vivo* ou *in vitro* do vírus rábico pode ser dividida em três fases. A primeira fase, ou inicial, inclui a ligação a receptores em células susceptíveis, entrada via fusão direta e desencapsidação das partículas virais com liberação da ribonucleoproteína helicoidal no citoplasma. É considerada a etapa de mais difícil entendimento e, apesar de ter sido estudada em diferentes sistemas de cultura de células, nenhum sistema *in vitro* ofereceu até agora explicação detalhada sobre a viropexia nas células musculares *in vivo*; a segunda fase, ou intermediária, inclui a transcrição e replicação do genoma viral; e a terceira fase, ou tardia, inclui a montagem e saída da célula infectada (WUNNER, 2002; RUPPRECHT, HANLON & HEMACHUDHA, 2002).

A fixação do envelope viral à célula é mediada pela interação da glicoproteína da espícula viral com receptores da superfície da célula hospedeira (BAER & LENTZ, 1991).

LENTZ et al (1982), verificaram o papel do receptor de acetilcolina (AChR) enquanto receptor para o vírus rábico. Seus resultados sugerem ser o AChR um dos envolvidos na patogenia da raiva, baseado na observação de que o antígeno rábico poderia ser localizado, por imunofluorescência, nas junções musculares, local de alta concentração desses receptores, logo após imersão do músculo diafragma de camundongo em uma suspensão de vírus rábico. Porém, os autores não excluem a possibilidade de outros componentes da superfície celular estarem envolvidos na ligação da partícula viral à célula.

A fixação do vírus rábico ao AChR pode explicar alguns aspectos da patogênese da raiva. Partículas virais liberadas no espaço extracelular após replicação periférica ligar-se-iam a receptores na junção neuromuscular, levando à infecção de outras fibras musculares e à entrada do vírus no Sistema Nervoso Periférico (SNP). Evidências sugerem, porém, a fixação do vírus rábico a outros determinantes da superfície da célula, ou a utilização de mecanismos de entrada não relacionados a receptores específicos, pelo fato de ser possível a infecção *in vitro* de algumas células desprovidas de AChR (BAER & LENTZ, 1991).

BROUGHAN & WUNNER (1995) propõem que componentes protéicos da membrana plasmática, podem estar fortemente envolvidos na ligação do vírus rábico à célula. A caracterização preliminar destas estruturas indica que se trata de uma proteína, ou complexo de proteínas, de alto peso molecular.

Para TSIANG (1985), o receptor para a ligação do vírus rábico à superfície da célula provavelmente não se restringe a uma molécula específica, sendo mais provável que haja uma estrutura complexa envolvendo vários componentes. A susceptibilidade de tantas células à infecção do vírus rábico pode ser resultado de diferenças quantitativas e qualitativas na estrutura molecular da membrana celular. Conseqüentemente, haveria tantos “complexos-receptores” para o vírus rábico quanto há tipos diferentes de células.

Em um estudo envolvendo o Vírus da Estomatite Vesicular (VSV), verificou-se que interações eletrostáticas entre o VSV e a superfície da célula podem desempenhar maior papel na ligação (e infecção) do vírus à célula, do que afinidade por moléculas específicas da superfície celular (BAILEY, MILLER & LENARD, 1984).

Após a internalização da partícula viral, a proteína G medeia a fusão pH-dependente com a membrana do endossoma, com posterior desencapsidação, liberando o nucleocapsídeo helicoidal (WUNNER, 2002).

O genoma do vírus rábico, por possuir polaridade negativa, não pode ser traduzido diretamente em proteína. O primeiro evento para infecção é, portanto, a transcrição do genoma RNA em molécula de RNA mensageiro (RNAm) complementar, de polaridade positiva. Os cinco genes estruturais (N, P, M, G e L) do genoma RNA são, então, transcritos em cinco fitas positivas de RNAm e uma fita inteira e intermediária de RNA positivo (antigenoma). O antigenoma RNA serve como modelo para replicação do genoma da progênie (fita negativa). As proteínas N, P, e L são sintetizadas a partir de seus respectivos RNAm, nos ribossomos livres do citoplasma, e a proteína G é sintetizada a partir do G-RNAm nos ribossomos da membrana do retículo endoplasmático rugoso. Alguns dos complexos moleculares N-P produzem, *in vivo*, corpúsculos de inclusão citoplasmática (corpúsculo de Negri), e alguns complexos N-P encapsidam as fitas de RNA. Após as fitas de RNA terem sido encapsidadas pelas proteínas N + P e a proteína L ser incorporada, para formar as estruturas ribonucleoproteicas da progênie, a proteína M se liga ao ribonucleocapsídeo e o condensa, formando a estrutura do esqueleto. Esta estrutura interage com a proteína G ancorada na membrana plasmática, montando a partícula viral, que brota através da membrana plasmática da célula infectada para o espaço extracelular ou intersticial adjacente (WUNNER, 2002).

IWASAKI, WIKTOR & KOPROWSKI (1973), pesquisando a seqüência de eventos que ocorrem durante a replicação do vírus rábico fixo em cultivo em monocamada de células BHK-21, descrevem que cinco minutos após a infecção, já se observava endocitose e fusão de algumas partículas virais. Trinta minutos após a infecção era notável o alinhamento de muitos vírions próximos à superfície das células, e depois de 1 hora já não havia mais evidência de entrada de vírus nas células. Observaram ainda que a fusão do envelope viral com a membrana plasmática pode ocorrer na superfície celular e nos vacúolos fagocíticos.

HUMMELER, KOPROWSKI & WIKTOR (1967) observaram modificações estruturais no citoplasma de células BHK-21, 8 a 9 horas após a infecção pelo vírus rábico. Setenta e duas horas depois, havia formação de partículas virais e brotamento pela membrana citoplasmática.

IWASAKI & CLARK (1975), estudando a replicação do vírus rábico em cérebro de camundongos lactentes e adultos, observaram brotamento de vírus pela membrana plasmática e trânsito das partículas virais entre células contíguas. Os autores concluem que, em infecções naturais, uma vez que o vírus ganha acesso ao SNC, ele pode se disseminar de célula a célula sem interferência de qualquer mecanismo extracelular, como a inativação por anticorpos e fagocitose.

### **1.1.3. Patogenia**

A raiva é a única doença viral em que o exato local e momento da entrada do vírus são conhecidos (BAER & LENTZ, 1991). O vírus geralmente é introduzido através de uma solução de continuidade produzida por mordedura, apesar de a penetração poder ocorrer através de membranas mucosas intactas e do trato digestivo, mas não através da pele íntegra. A infecção natural por via aérea é possível em circunstâncias excepcionais, como, por exemplo, em cavernas albergando grande número de morcegos infectados (KAPLAN, 1996).

Existem relatos de casos de raiva humana adquirida através do transplantes de órgãos. Os primeiros casos de transmissão iatrogênica de raiva ocorreram através de transplantes de córneas (MEDIA RELEASE, 2004). Casos de raiva humana adquirida por transplantes de órgãos como fígado, rins e pulmão, ocorreram nos Estados Unidos e na Alemanha (CDC, 2004a; CDC, 2004b; BBC NEWS, 2005).

Uma seqüência de eventos ocorre após a inoculação do vírus rábico. As etapas incluem a replicação no tecido periférico, a migração centrípeta ao longo do SNP para a medula espinhal e o cérebro, a rápida disseminação no SNC e a difusão centrífuga, através dos nervos, para vários órgãos, incluindo as glândulas salivares (JACKSON, 2002).

Em um experimento sobre a patogênese do vírus rábico utilizando camundongos como modelo, observou-se que a amputação do membro inoculado até determinado período após a inoculação era capaz de evitar a morte do animal. Estes achados confirmaram a permanência do vírus no sítio periférico de

inoculação ou próximo a este durante a maior parte do período de incubação, após o que ele avança rapidamente ao longo do SNP para o SNC (BAER & LENTZ, 1991).

A migração centrípeta do vírus rábico para o SNC acontece pelos axônios motores, e talvez pelos sensoriais, dos nervos periféricos. Estudos indicam que o caminho motor é mais importante que o sensitivo na disseminação do vírus rábico para o SNC (JACKSON, 2002).

O transporte do vírus ocorre através dos microtúbulos, e a interrupção do fluxo axoplasmático periférico, através da ligadura ou secção, ou por intervenção farmacológica na função dos microtúbulos, impede o transporte do vírus rábico do sítio de inoculação periférico para o SNC, embora nenhum destes procedimentos seja capaz de afetar negativamente a produção do vírus nas células, depois de estabelecida a infecção (LYCKE & TSIANG, 1987).

A replicação do vírus rábico fixo e de rua, em macrófagos e células precursoras de macrófagos, de origens murina e humana foi estudada por RAY, EWALT & LODMELL (1995). Os autores sugerem que os macrófagos possam funcionar como reservatórios da infecção *in vivo*, seqüestrando vírus, que seriam subseqüentemente reativados, resultando em infecção clínica e morte do paciente.

RAY et al (1997) observaram a participação de células gliais na replicação, persistência e patogênese do vírus rábico. Avaliaram o potencial de culturas primárias de micróglia e astrócitos murino, felino e humano serem infectadas *in vitro*, confirmando a presença do antígeno em 94% das células pela técnica de imunofluorescência direta, e replicação de vírus em 88% das células. Os autores sugerem que células da micróglia e astrócitos possam ter função na patogenia da doença, talvez contribuindo para disseminação, persistência ou disfunção neuronal. Além disso, podem estar associadas à patogênese afetando a saúde fisiológica dos neurônios através da liberação de citocinas ou neurotoxinas.

A migração centrífuga a partir do SNC para os sítios periféricos ao longo dos neurônios é essencial para a transmissão do vírus rábico para seus hospedeiros naturais. A infecção da glândula salivar é necessária para a transferência de fluidos orais infecciosos pelos transmissores raivosos. As glândulas salivares recebem inervação parassimpática através dos nervos facial e

glossofaríngeo e inervação simpática via gânglio cervical superior (ou cranial), que são fontes de disseminação do vírus para este tecido (JACKSON, 2002).

Estudos tanto em raiva natural quanto experimental demonstraram infecção envolvendo neurônios relacionados a uma variedade de órgãos extraneurais, incluindo medula adrenal, gânglio cardíaco, plexos do trato gastrointestinal, glândulas salivares, fígado e pâncreas exócrino, levando a infecção de células das glândulas salivares, epitélio da língua, músculos cardíaco e esquelético e ilhotas pancreáticas, dentre outras (JACKSON, 2002).

HUMMELER, KOPROWSKI & WIKTOR (1967), estudando o comportamento do vírus rábico em cultura de células, observaram que, após sete dias de incubação, o brotamento de vírus pela superfície celular era mínimo, mas havia enorme quantidade de partículas intracelulares. Os autores levantam a hipótese de que esta alta retenção de vírus possa ter alguma relação com a lenta disseminação do vírus *in vivo*, como fica evidente nos longos e irregulares períodos de incubação da raiva.

O período de incubação depende da quantidade de vírus introduzida e do sítio de inoculação. A proximidade deste sítio com o SNC aumenta a probabilidade de um período de incubação curto. A velocidade estimada de migração do vírus é de 15 a 100 mm por dia (WHO, 2005b).

Em condições naturais, humanos e animais passam por um extenso período de incubação, que se segue à exposição e possui grande importância biológica na manutenção da raiva enzoótica. Em humanos, este período é geralmente de 20 a 90 dias, podendo passar de um ano, embora isso raramente aconteça (JACKSON, 2002).

Em bovinos, eqüinos e outros animais de produção, a incubação do vírus varia de 25 a 150 dias, ou mais. A persistência da doença varia de 2 a 10 dias, ao que sobrevém a morte pela paralisia generalizada (FEKADU, 1991).

Cães e gatos apresentam período de incubação que varia de 7 dias a vários meses (FEKADU, 1991). Nestes animais, a eliminação de vírus pela saliva se dá de 2 a 5 dias antes do aparecimento dos sinais clínicos, podendo persistir durante toda evolução da doença. A morte do animal ocorre, em média, entre 5 a 7 dias após a apresentação dos sintomas (BRASIL, 2002).

Em relação aos animais silvestres, há poucos estudos sobre o período de incubação, sabendo-se que varia de espécie para espécie (BRASIL, 2002).

#### 1.1.4. Sintomatologia

Na maioria dos casos de raiva a manifestação patológica no SNC é a encefalomielite aguda (IWASAKI & TOBITA, 2002).

Em humanos, os primeiros sintomas são não-específicos, consistindo de febre, dor de cabeça e mal-estar. Dor ou prurido no sítio de exposição estão presentes em aproximadamente metade dos casos. Com o progresso da doença, os sintomas neurológicos aparecem, incluindo insônia, ansiedade, confusão, paralisia leve ou parcial, excitação, alucinações, agitação, hipersalivação, dificuldade de deglutição e hidrofobia. A morte advém dias após a manifestação destes sintomas (CDC, 2005).

Nos animais, a raiva pode se manifestar de duas formas: raivosa ou furiosa e parálitica ou muda (FEKADU, 1991).

Na fase prodrômica, os animais mudam seu comportamento agindo como se estivessem acuados e com medo, passando a se esconder ou se isolar, demonstrando certa inquietude. Posteriormente, já numa fase de excitação (furiosa), os sinais da doença são mais facilmente reconhecidos. O cão ataca objetos inanimados, desconhece o próprio dono, mutila-se, anda sem rumo, apresenta sialorréia e dificuldade de deglutição de alimento por paralisia dos músculos da laringe, midríase, latido bitonal, alotriofagia (apetite pervertido) e, num estágio avançado da doença, convulsões, incoordenação, paralisia, coma e morte por parada respiratória (FEKADU, 1991).

De um modo geral, em animais de produção (bovinos, bubalinos, eqüinos, caprinos, ovinos e outros) a forma parálitica é predominante. Estes animais costumam apresentar sintomatologia semelhante, onde o sinal mais característico é a paralisia do músculo masseter, e os sintomas propriamente paráliticos são observados através da dificuldade motora (FEKADU, 1991).

Animais silvestres geralmente apresentam a forma furiosa, muito embora ainda sejam necessários estudos sobre o comportamento do vírus rábico nessas espécies, de acordo com cada ecossistema (FEKADU, 1991).

### 1.1.5. Epidemiologia

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a raiva encontra-se amplamente distribuída pelo mundo e está presente em todos os continentes. O número de países, territórios ou áreas livres de raiva é pequeno comparado ao de áreas onde a doença é endêmica. Japão, Grécia, Portugal, Uruguai e Chile estão entre os países considerados livres de raiva (WHO, 2005a), o que significa dizer que nenhum caso de infecção nativa por lissavirus foi confirmada em humanos ou animais, incluindo morcegos, nos últimos dois anos, e que existe um adequado sistema de vigilância em funcionamento (WHO, 2005b).

A OMS estima que aproximadamente 55.000 mortes humanas, por raiva transmitida por caninos, ocorram a cada ano, principalmente na Ásia e África, resultado de uma infraestrutura de saúde pobre e de medidas inadequadas de controle (WHO, 2005b).

Canídeos em geral, principalmente os domésticos, são os grandes responsáveis pela transmissão da raiva (KING & TURNER, 1993), sendo o cão o transmissor mais importante, responsável por mais de 99% dos casos de raiva humana no mundo. A raiva canina ocorre em mais de 80 países e territórios, principalmente naqueles em desenvolvimento, sendo que metade da população mundial vive nestas áreas endêmicas (WHO, 2005b).

Nos locais onde a raiva canina está sob controle, o morcego ganha maior importância na cadeia de transmissão da doença (SES/DF, 2005). Bovinos, eqüinos, caprinos, ovinos, suínos, bubalinos e outros animais domésticos, apresentam potencial de transmissão ao homem em casos esporádicos (BRASIL, 2002).

No Brasil, a raiva é endêmica, em grau diferenciado de acordo com a região geopolítica (BRASIL, 2002). No período de 1986 a 2003, foram notificados 675 casos de raiva humana, sendo que as regiões Nordeste (59%) e Norte (21%) contribuíram com a maior parte dos casos. Entre os anos de 1994 e 2003, a espécie agressora predominante foi o cão, responsável por 80% dos casos humanos, seguido pelos morcegos, com 8,2% dos casos. Somente no ano de 2003, foram notificados 17 casos de raiva humana, sendo 14 por cães e 3 por morcegos. Neste ano, estas fontes de infecção foram responsáveis por mortes na Bahia, Maranhão e Espírito Santo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Em 2004, o morcego passa a ocupar o 1º lugar dentre as espécies animais que estiveram envolvidas na transmissão da doença para humanos, no Brasil (SES/DF, 2005). Neste ano, ocorreram dois surtos de raiva humana transmitida por morcegos no Estado do Pará, municípios de Portel (15 casos) e Viseu (6 casos) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005a). Um terceiro surto no mesmo Estado foi notificado no município de Augusto Corrêa, em 2005, com 15 casos, sendo 10 confirmados laboratorialmente. Todos os casos de raiva humana confirmados laboratorialmente resultaram em variante antigênica 03, compatível com amostras isoladas de morcego *Desmodus rotundus* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005b).

Um novo foco de raiva humana transmitida por morcego, com 2 casos confirmados laboratorialmente, ocorreu no município de Godofredo Viana, no Estado do Maranhão, localizado a 100 km do município de Augusto Corrêa, onde ocorreu o primeiro surto de raiva humana transmitido por morcego, em 2005. A avaliação preliminar do surto indica forte relação entre os processos produtivos e as mudanças ambientais provocadas, principalmente pela extração do ouro. Foram identificados, na localidade, antigos abrigos abandonados deixados pela intensa ação dos trabalhos de garimpo. Esses abrigos criaram condições favoráveis para as populações de quirópteros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005a).

#### **1.1.6. Tratamento profilático**

No homem, o tratamento pós-exposição, que inclui limpeza da ferida com água e sabão, e o uso de soro e/ou vacina, deve ser instituído o quanto antes, considerando que o vírus seja removido ou neutralizado antes que possa ganhar os nervos periféricos, onde ele estaria protegido de uma resposta imune natural (KING & TURNER, 1993).

A prescrição do tratamento profilático anti-rábico humano com a vacina de cultivo celular, atualmente adotada no Brasil, varia de acordo com alguns fatores, onde os mais importantes são: o tipo de acidente (leve ou grave) e as condições do animal agressor. Os tratamentos mais longos são compostos por

cinco doses de vacina, nos dias 0, 3, 7, 14 e 28, sendo indicados para qualquer tipo de acidente onde o animal agressor desapareça, se torne raivoso ou morra sem possibilidade de diagnóstico, e em acidentes com animais silvestres ou de produção (BRASIL, 2002).

A espécie animal, a disponibilidade do animal para observação ou testes laboratoriais e a situação epidemiológica local são fatores importantes ao se considerar a necessidade da terapia pós-exposição (JACKSON, 2003).

Morcegos e outros animais silvestres, como macacos, raposa, guaxinim, quati e gambá, devem ser classificados como animais de risco, mesmo quando domiciliados, uma vez que nesses animais a raiva não é bem conhecida. São considerados de baixo risco para a transmissão da raiva, a ratazana de esgoto, rato de telhado, camundongo, cobaia ou porquinho da índia, hamster e coelho (BRASIL, 2002).

O custo de cinco doses de vacina, necessárias ao tratamento pós-exposição completo, pode chegar a mais de US\$ 735.00, e o da imunoglobulina anti-rábica, para um paciente de 75 kg, que requer 10 mL (1500 UI), a aproximadamente US\$ 700.00 (JACKSON, 2003).

Apesar de o desenvolvimento de vacinas anti-rábicas mais efetivas ter sido o grande avanço na prevenção da raiva, o uso eficaz destas vacinas depende da habilidade de se determinar de forma rápida e precisa se um animal agressor é raivoso (SMITH, 1991).

Uma vez concluído o diagnóstico laboratorial do animal suspeito, sendo o resultado negativo, e partindo de um laboratório de diagnóstico idôneo, este pode ser aceito com segurança, podendo o tratamento pós-exposição humano ser interrompido ou modificado neste momento. Deve ser observado que um laudo positivo, obtido por qualquer uma das técnicas reconhecidas, sobrepõe-se a um resultado negativo (MESLIN & KAPLAN, 1996). A Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) também indica suspensão do tratamento em caso de diagnóstico laboratorial negativo para raiva (BRASIL, 2002).

### 1.1.7. Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial da raiva deve ser realizado com os seguintes agravos: tétano, pasteureloses por mordedura de gato e de cão, infecção por vírus B (*Herpesvirus simiae*) por mordedura de macaco, botulismo, cinomose, febre por mordida de rato, febre por arranhadura de gato (linforreticulose benigna de inoculação), encefalite pós-vacinal, quadros psiquiátricos, tularemia e outras encefalites virais (BRASIL, 2002).

## 1.2. DIAGNÓSTICO DA RAIVA

O diagnóstico laboratorial da raiva, realizado geralmente através do exame *post-mortem* de animais agressores ou que estejam envolvidos com potencial exposição de humanos à doença, é de extrema importância para o controle e prevenção desta zoonose, que leva inevitavelmente à morte uma vez manifestados sintomas (LENNETTE & EMMONS, 1971; TRIMARCHI & SMITH, 2002), mas que pode ser prevenida pela terapia anti-rábica pós-exposição (SMITH, 1991).

Segundo a OMS e a OIE (*World Organization for Animal Health*), o diagnóstico definitivo da raiva só pode ser obtido através das técnicas laboratoriais (WHO, 2005b; OIE, 2005).

No início do século XIX, Georg Gottfried Zinke demonstrou que o diagnóstico clínico da raiva poderia ser experimentalmente confirmado pela transmissão da doença para cães e coelhos saudáveis através da infecção de feridas cutâneas com a saliva de animais raivosos (SUREAU, RAVISSE & ROLLIN, 1991; PEARCE, 2002).

Em 1879, Victor Galtier introduziu coelhos domésticos como animais experimentais para o diagnóstico e o estudo da raiva, mas o conceito moderno da doença foi desenvolvido por Pasteur e seus colaboradores. A descoberta de que o agente infeccioso da raiva poderia ser recuperado a partir do cérebro de um animal morto pela doença, e o desenvolvimento da inoculação intracerebral por

Roux, abriram caminhos para um extenso estudo sobre a doença (JOHNSON, 1965; RUPPRECHT, HANLON & HEMACHUDHA, 2002; MATTOS, MATTOS & RUPPRECHT, 2001; PEARCE, 2002).

Pasteur, Chamberland e Roux demonstraram, em 1884, que a inoculação intracerebral era a técnica de escolha para a propagação seriada do vírus em coelhos e para obtenção do “vírus fixo” usado para a primeira vacinação humana contra a raiva, em 1885 (SUREAU, RAVISSE & ROLLIN, 1991).

A natureza ultramicroscópica do agente infeccioso foi postulada por Pasteur, mas não estava comprovada até que Remlinger, em 1903, demonstrou que ele era capaz de passar por filtros Berkefeld, impermeáveis às bactérias (JOHNSON, 1965).

O diagnóstico laboratorial da raiva seguiu os avanços da microscopia, da teoria celular e da histopatologia, que ocorreram no século XIX (KING & TURNER, 1993).

### **1.2.1. Métodos Diagnósticos**

#### 1.2.1.1. Método histopatológico

Em 1903, Adelchi Negri demonstrou pela primeira vez, através da utilização da coloração de Mann, a presença de inclusões intracitoplasmáticas específicas, em células nervosas, particularmente no hipocampo (corno de Ammon) de animais raivosos (SUREAU, RAVISSE & ROLLIN, 1991; KING & TURNER, 1993), tornando possível o diagnóstico microscópico da raiva (JOHNSON, 1965).

Estas inclusões, denominadas “corpúsculos de Negri”, foram descritas como inclusões eosinofílicas arredondadas ou ovais no citoplasma das células nervosas de animais infectados com raiva, variando de 0,25 a 27  $\mu\text{m}$  (CDC, 2005).

A seleção de espécimes e as técnicas de fixação e coloração para demonstrar a presença destes corpúsculos, foram detalhados por TIERKEL &

ATANASIU (1996) e por LÉPINE & ATANASIU (1996). Secções de corno de Amonn, córtex cerebral, cerebelo, medula e gânglio cervical superior devem ser examinadas para sinais de meningoencefalomielite e lesões específicas (corpúsculos de Negri) (LÉPINE & ATANASIU, 1996).

Corpúsculos de Negri podem ser detectados através de métodos de coloração como Mann e Sellers, e são encontrados principalmente na base piramidal central do corno de Amonn (LÉPINE & ATANASIU, 1996).

Os corpúsculos de Negri são considerados patognomônicos da raiva, embora sua ausência não descarte a doença (KING & TURNER, 1993). Corpúsculos de inclusão não específicos formados durante outras infecções virais que não a raiva podem ser interpretados como corpúsculo de Negri, gerando resultados falso-positivos (LENNETTE & EMMONS, 1971), especialmente em roedores e gatos. A coloração de Sellers, para detecção dos corpúsculos de Negri, detecta de 80% a 85% das infecções reveladas por outras técnicas (VELLECA & FORRESTER, 1981).

#### 1.2.1.2. Imunofluorescência Direta

A presença dos corpúsculos de Negri foi o principal critério de diagnóstico da raiva até 1958, quando Goldwasser & Kissling adaptaram, para o diagnóstico da raiva, a técnica de Imunofluorescência Direta (IFD), desenvolvida em 1950 por Coons & Kaplan (DEAN, ABELSETH & ATANASIU, 1996). Esta técnica foi posteriormente modificada por Dean & Abelseth, em 1973, e por Kissling, em 1975 (MESLIN & KAPLAN, 1996).

A técnica de IFD é uma grande ferramenta na pesquisa da raiva. Grande parte dos conhecimentos adquiridos desde 1958 a respeito da infecção, patogenia, pantropismo e variação antigênica, foi através dos procedimentos de imunofluorescência (TRIMARCHI & DEBBIE, 1991).

A IFD é uma técnica rápida e segura, cuja sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da raiva aproximam-se de 100% (LENNETTE & EMMONS, 1971), devendo ser empregada em todos os laboratórios que desenvolvem esta função. Além de microscópio de qualidade, o sucesso do teste

depende de técnicos bem treinados e conjugado anti-rábico de boa qualidade (DEAN, ABELSETH & ATANASIU, 1996; MESLIN & KAPLAN, 1996).

A OMS e a OIE estabelecem a IFD como a técnica padrão ouro para detecção do antígeno da raiva e recomendam, para aumentar sua sensibilidade, que sejam examinados fragmentos de córtex cerebral, cerebelo e corno de Ammon (WHO, 2005b; OIE, 2005).

A precisão da técnica de IFD depende do estado de conservação da amostra, das áreas do cérebro amostradas para confecção do teste e da distribuição do vírus, que pode ser irregular (WHITFIELD et al, 2001). Materiais em decomposição diminuem bastante a sensibilidade da técnica, restringindo a segurança de sua utilização como critério de decisão da continuidade de tratamentos pós-exposição (TRIMARCHI & DEBBIE, 1991).

ALBAS et al (1999) encontraram divergência nos resultados de IFD e inoculação intracerebral em camundongos desmamados, ao avaliarem cérebros de caninos submetidos à decomposição progressiva. Amostras positivas estocadas à temperatura ambiente revelaram-se negativas ao teste de inoculação após 48 horas de exposição à temperatura de 25 a 29 °C, e após 72 horas a IFD revelou uma amostra falso-negativa. Portanto, os autores sustentam que o período limite para o diagnóstico seguro está entre 24 e 48 horas após a morte do animal, razão pela qual eles sugerem que o material suspeito seja enviado ao laboratório em até 48 horas, para que se evitem resultados falso-negativos.

O princípio da técnica de IFD consiste na marcação do anticorpo da fração gamaglobulina de um soro com corante fluorescente, o que não interfere em sua capacidade de reagir com o antígeno específico. Por conseguinte, quando o anticorpo anti-rábico marcado entra em contato com o antígeno rábico presente no tecido infectado, uma reação antígeno-anticorpo ocorre. Os sítios de reação específica podem, então, ser detectados pela fluorescência do corante acoplado ao complexo antígeno-anticorpo. Nenhuma fluorescência está presente numa reação negativa (VELLECA & FORRESTER, 1981).

O corante mais comumente utilizado no diagnóstico de raiva é o isotiocianato de fluoresceína (DEAN, ABELSETH & ATANASIU, 1996). O anticorpo primariamente responsável pela coloração no teste de IFD é aquele específico para o antígeno nucleocapsídeo do vírus. O vírus rábico é replicado no citoplasma da célula, podendo gerar grandes inclusões, que parecem ser coleções de antígenos nucleocapsídeos, e se coram bem ao teste de IFD. Elas

são provavelmente os mesmos corpúsculos de Negri clássicos. Ao microscópio de imunofluorescência, elas geralmente parecem arredondadas ou ovais, de contorno liso e a coloração fluorescente é geralmente mais forte na periferia. Coleções menores de antígenos se coram por todo o citoplasma e aparecem como partículas fluorescentes granulares ou similares à poeira (VELLECA & FORRESTER, 1981).

A IFD é uma técnica altamente sensível para detecção do antígeno rábico em espécimes frescos, congelados ou conservados em glicerina. Contudo, pode também ser desenvolvida em tecidos fixados, que devem ser tratados com enzimas proteolíticas, como tripsina e pepsina, para revelar o antígeno. A sensibilidade do teste utilizando espécimes fixados pode chegar a 90-100% em comparação à obtida com o uso de espécimes frescos, mas recomenda-se a utilização de material fresco (MESLIN & KAPLAN, 1996).

WHITFIELD et al (2001) avaliaram o uso da IFD em tecidos frescos congelados e em tecidos fixados em formalina tampão 10% e submetidos à digestão enzimática, e obtiveram 99,8% de concordância entre os resultados. Este estudo demonstrou que a sensibilidade e a especificidade da IFD em materiais fixados em formalina, para o diagnóstico da raiva, são comparáveis ao diagnóstico padrão em material fresco ou congelado, desde que a digestão enzimática seja realizada de forma adequada.

A importância do diagnóstico laboratorial para a decisão médica levou à necessidade de se adotar o isolamento do vírus como procedimento de rotina. Desta forma, o teste de IFD deve ser complementado pelo isolamento do vírus, realizado através da inoculação intracerebral em camundongos ou da inoculação em cultura de células (LENNETTE & EMMONS, 1971; KOPROWSKI, 1996; WHO, 2005b; OIE, 2005; WOLDEHIWET, 2005).

#### 1.2.1.3. Inoculação intracerebral em camundongos

O teste de inoculação intracerebral (IC) em camundongo, desenvolvido por Webster & Dawson [WEBSTER & DAWSON (1935) apud BOURHY et al (1989)], foi o primeiro a ser implantado com a finalidade de

complementar a técnica de IFD (BOURHY et al, 1989). Apesar de sua simplicidade, a obtenção de resultados confiáveis no teste de IC depende muito da precisão de sua execução (KOPROWSKI, 1996).

O camundongo suíço albino é o animal de escolha para o teste de IC para o diagnóstico de raiva, mas outras linhagens podem ser utilizadas, uma vez que todas são igualmente susceptíveis à inoculação intracerebral do vírus rábico de rua (SUREAU, RAVISSE & ROLLIN, 1991). É essencial que os animais escolhidos para inoculação estejam saudáveis. Os animais inoculados devem ser observados diariamente, por um período de 21 dias, quando são utilizados camundongos desmamados (KOPROWSKI, 1996).

ATANASIU, GAMET & GUILLON (1968) afirmam que a IC de camundongos desmamados, apesar de ser uma boa técnica para o diagnóstico da raiva, é bastante demorada, e sugerem a eutanásia de parte dos animais inoculados a partir do sexto dia pós-inoculação, com posterior análise do tecido cerebral pela técnica de IFD, para obtenção de resultados mais precoces.

A utilização da IFD para acelerar o teste de IC em camundongos também foi relatada por WEBSTER, CASEY & CHARLTON (1976), onde camundongos desmamados inoculados com materiais negativos ou fracamente positivos à IFD, eram sacrificados antes da manifestação dos sintomas. Seus resultados mostraram ser possível detectar camundongos positivos desde o sexto dia pós-inoculação, o que correspondeu à metade do tempo necessário à manifestação dos sintomas em amostras negativas à IFD. Os autores sugerem que, em casos onde exista risco envolvendo humanos expostos, um número suficiente de camundongos deve ser inoculado para permitir a eutanásia seqüencial dos animais.

Camundongos com 3 a 4 semanas de idade são geralmente utilizados na maioria dos laboratórios de diagnóstico (VELLECA & FORRESTER, 1981). No entanto, camundongos lactentes (preferencialmente com menos de 3 dias de vida), são mais susceptíveis à IC do vírus rábico do que camundongos desmamados ou adultos, e devem ser utilizados sempre que possível. A utilização de camundongos lactentes permite o isolamento de vírus em espécimes de baixa concentração viral, que poderiam ser diagnosticados falso-negativos, caso somente camundongos adultos, que são menos sensíveis, fossem inoculados. Uma vez que pode haver confusão devido a mortes não específicas, recomenda-se o uso combinado do teste de inoculação e da IFD (KOPROWSKI, 1996).

O uso de camundongos com menos de três dias de idade, em lugar de desmamados, é indicado pela OMS, que propõe a redução do período de observação desses animais, que devem ser sacrificados 3 a 4 dias (ou mais) após a inoculação, e seus cérebros examinados por IFD (WHO, 2005b). A OIE faz semelhante observação a respeito dos camundongos lactentes, porém mais precisa. Segundo esta Organização, para obtenção de resultados mais rápidos, pode-se analisar um camundongo por IFD nos dias 5, 7, 9 e 11 pós-inoculação (OIE, 2005).

SILVA (2000), em um experimento que avaliou a sensibilidade de camundongos lactentes comparada a de desmamados, através da titulação de amostras de vírus rábico de rua nestes dois sistemas, comprovou a maior sensibilidade de camundongos lactentes em relação a desmamados. Além disso, verificou que o diagnóstico pode ser obtido seguramente no sétimo dia após a inoculação dos animais, quando toda a ninhada deve ser sacrificada e ter seus cérebros submetidos ao exame de IFD. Este procedimento foi capaz de detectar uma amostra positiva, mas que se revelou negativa à IC de camundongos desmamados.

#### 1.2.1.4. Inoculação em cultura de células

As técnicas de cultivo de tecido foram inicialmente aplicadas no estudo do vírus rábico em 1913, por Noguchi e Levaditi, que relataram a primeira propagação bem sucedida do vírus em glânglio nervoso mantido em meio contendo plasma coagulado de macaco. Até o desenvolvimento de várias linhagens e sublinhagens de células, o acesso ao estudo do vírus rábico e sua interação com a célula hospedeira não eram possíveis (KING, 1996).

Em 1930, Stoel experimentou, pela primeira vez, infectar uma cultura primária de cérebro de embrião de galinha. Durante os dez anos seguintes, pesquisas revelaram a propagação de amostras do vírus rábico fixo em culturas de cérebro de embrião de camundongo. Em 1942, Plotz & Reagan infectaram uma cultura primária de embrião de galinha com vírus rábico de rua. Em 1953, houve a publicação dos resultados de uma pesquisa com a adaptação

do vírus rábico a cultivo celular. Em 1956, Vieuchange descreveu a susceptibilidade de células não-neurais ao vírus rábico (PÉREZ & PAOLAZZI, 1997).

Experimentos utilizando cultivo de amostras de vírus rábico fixo e de rua em células de tumor de epidídimo de camundongo originaram o primeiro relato de inclusões intracitoplasmáticas semelhantes a corpúsculos de Negri em um sistema celular (KING, 1996).

Em 1958, Kissling alcançou o primeiro avanço significativo, descrevendo a replicação do vírus rábico em cultura primária de célula de rim de hamster (HK). Empregando uma amostra de vírus fixo CVS (*Challenge Virus Standard*), obteve sobrenadantes com títulos que variaram de  $10^{0,6}$  até  $10^{3,5}$  DL<sub>50</sub> em camundongos. O autor utilizou ainda três amostras de vírus de rua de glândulas salivares (duas de cão e uma de vaca). Nenhum vírus foi recuperado dos sobrenadantes de 2 culturas. Porém, a terceira cultura, de um dos cães, apresentou título de  $10^{6,1}$  DL<sub>50</sub> em camundongos, e foi mantida por quatro passagens, sem perda do título em camundongos (KISSLING, 1958).

Dentre as linhagens celulares que podem servir de suporte para a proliferação do vírus rábico estão células de rim de hamster, células de endotélio de coelho, células renais de cão, e células diplóides humanas (WIKTOR, 1976).

Em 1960, Fenje obteve a primeira vacina anti-rábica produzida em cultura de célula, empregando amostra de vírus SAD (*Street-Alabama-Dufferin*), originalmente isolada do cérebro de um cão raivoso (PÉREZ & PAOLAZZI, 1997).

CLARK (1972) relatou a propagação bem sucedida do vírus rábico em várias linhagens de células de origem pecilotérmica, utilizando células RTG-2 (truta), FMH (peixinho de água doce), RPH67.123 e BA 68.1 (anfíbio), células de víbora, de iguana, de lagartixa e de tartaruga, num total de 9 linhagens de vertebrados pecilotérmicos. Todas as células foram examinadas por IFD e, enquanto as de origem anfíbia pareceram completamente refratárias à infecção, células de peixe e réptil foram susceptíveis. Culturas de células de víbora foram positivas por mais de 107 passagens e células de lagartixa mantiveram-se infectadas por 64 passagens. O autor revela ainda que, após 81 passagens em células de víbora ou 40 em células de lagartixa, o vírus parecia atenuado e perdia a patogenicidade para camundongos adultos.

As linhagens celulares BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*, linhagem 21) (RUDD, TRIMARCHI & ABELSETH, 1980) e CER (*Chick embryo-related*) (SMITH

et al, 1977) foram as primeiras a serem relatadas como adequadas à rotina de diagnóstico da raiva. A linhagem celular CER foi desenvolvida por Motohashi, no Japão, e utilizada pela primeira vez em 1975, nos Estados Unidos, por Wiktor, mantendo crescimento eficiente de amostras de vírus rábico adaptadas em laboratório. Não é possível definir a origem precisa das células CER, que foram desenvolvidas durante passagens de células embrionárias de galinha, e a introdução inadvertida de células de hamster durante a passagem das células de embrião não é descartada. Tanto células CER quanto de rim de hamster possuem cariótipos heteroplóides similares (SMITH et al, 1977).

Em experimento que avaliou, através da IFD, a infecção de cultura de células CER e neuroblastoma murino (clone N18) por vírus rábico de rua, pôde ser observado que ambas são susceptíveis à infecção viral, e oferecem resultados mais rápidos que a IC de camundongos desmamados (SMITH et al, 1978).

SEGANTI et al (1990) investigaram a susceptibilidade *in vitro* de células de mamífero [IMR-32 (neuroblastoma humano) e HeLa S3 (carcinoma epitelíode de cérvix humana)], de ave (CER), de peixe [EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprini*)] e de artrópode (*Aedes albopictus*). Todas mostraram alta susceptibilidade ao vírus CVS, com exceção da célula de artrópode, cuja detecção de antígeno específico foi inferior e a produção de vírus foi nula.

GALLINA et al (1998), avaliaram a produção de antígeno rábico em células BHK-21 (C 13) em monocamadas e aderidas a *microcarriers* (biorreator), obtendo títulos muito mais altos e em larga escala com a utilização do segundo sistema.

Células McCoy (fibroblasto de camundongo - ATCC: CRL-1696) permitiram fácil isolamento do vírus rábico, inclusive de materiais com baixa carga viral (NOGUEIRA, 1998). Comparadas a células neuroblastoma murino (clone N2a), em experimento que avaliou o isolamento do vírus rábico de uma amostra de morcego, as células McCoy apresentaram melhores resultados de sensibilidade e especificidade (95%) em relação a células N2A (90%) (NOGUEIRA, 2004).

A susceptibilidade da linhagem de células de Glioma de rato C6 (Clone CCL-107) às amostras fixa e de rua do vírus rábico foi caracterizada por BORDIGNON et al (2001). As células C6, originárias de tumores cerebrais, produziram títulos virais e quantidade de glicoproteína semelhantes aos

observados em células BHK-21 (C-13), tanto com amostra de vírus fixo, quanto com vírus de rua, sendo capazes de produzir os dois principais componentes do vírus rábico, a nucleoproteína e a glicoproteína, agregando-as corretamente, e produzindo novos vírions. Comparadas a células neuroblastoma murino (NA-C1300), as células C6 provaram ser tão sensíveis quanto as NA, na detecção de 10 amostras de vírus rábico de rua, com 100% de positividade para ambas as células.

WEBSTER & CHARLTON (1989), estabeleceram que a produção de altas concentrações de glicoproteína é a principal responsável pela infectividade, em estudo que avaliou a infectividade de uma amostra de vírus rábico do Canadá em culturas de células neuroblastoma (NA-C1300) e BHK-21 (C13).

Testes utilizando células BHK-21, CER e neuroblastoma murino, demonstraram que a infecção pelo vírus da raiva poderia ser detectada em 4-5 horas e até 5 dias após a inoculação. Além disso, comprovou-se que células BHK-21 seriam comparáveis, em sensibilidade, a camundongos desmamados (MESLIN & KAPLAN, 1996), embora algumas vezes demonstrassem sensibilidade inferior (WEBSTER & CASEY, 1996). Em contraste, células neuroblastoma seriam mais sensíveis que camundongos à infecção pelo vírus rábico de rua (MESLIN & KAPLAN, 1996).

Segundo UMOH & BLENDEN (1983) e RUDD & TRIMARCHI (1987), a diferença de sensibilidade entre células neuroblastoma e BHK-21 e outras linhagens celulares pode estar associada à origem neural da primeira.

Apesar de células neuroblastoma murino serem indicadas pela maioria dos autores como as mais apropriadas ao diagnóstico de raiva, BORDIGNON et al (2001), relatam que, de acordo com sua experiência, estas são células difíceis de serem mantidas, têm baixa taxa de proliferação e raramente formam monocamadas confluentes, enquanto que células C6 são robustas, mais fáceis de cultivar e possuem alta taxa de proliferação. Já células BHK-21 são, segundo RUDD & TRIMARCHI (1987), bastante resistentes, têm alta taxa de proliferação, mas freqüentemente demonstram baixa sensibilidade a amostras do vírus rábico de rua.

Em um estudo com 2 amostras de vírus de rua de cangambá, utilizando células neuroblastoma murino (NA-C1300) e BHK-21 (C13), WEBSTER, CHARLTON & CASEY (1988) demonstraram que as amostras de

vírus rábico de rua podem diferir em propriedades biológicas, o que se refletiria em suas características de isolamento e replicação em cultura de células.

CHITRA, PANDIT & KALYANARAMAN (1988), comparando as técnicas de IFD, histopatologia (coloração de Sellers) e isolamento do vírus rábico em células neuroblastoma (N2A) e camundongos desmamados, observaram que todas as amostras, exceto as de bovinos, apresentaram melhores resultados em células N2A. Os autores atribuem essa diferença ao fato de talvez as amostras de vírus dos espécimes bovinos, em particular, não serem capazes de se adaptar e serem replicadas em cultivo celular em primeira passagem.

A sensibilidade dos sistemas de isolamento do vírus rábico, especialmente em cultivo de células, pode sofrer alterações causadas por fenômenos de “autointerferência”, que estão diretamente relacionados à alta concentração de partículas, tanto celulares quanto de vírus defectivos, no inóculo. A infecção de células neuroblastoma (clone NA) é aparentemente bastante sensível à “autointerferência”, pela adição experimental de vírus defectivos ao inóculo (CLARK, 1980).

Gangliosídeos e fosfolipídios presentes nas suspensões de cérebro podem igualmente funcionar como substâncias inibitórias, uma vez que reduzem a porcentagem de células infectadas em ensaios *in vitro* (RUDD & TRIMARCHI, 1989).

RUDD, TRIMARCHI E ABELSETH (1980), comparando células BHK-21 (C13) e a IC em camundongos desmamados, afirmam que ambos tiveram *endpoints* (maior diluição capaz de causar infecção) comparáveis, e que a utilização destas células parece confiável e prática para o isolamento do vírus rábico de rua, como teste de rotina.

O Dietilaminoetil-Dextrano (DEAE-D) foi utilizado em cultura de células BHK-21, com o objetivo de avaliar seu efeito na infecção pelo VSV. Os resultados mostraram aumento da síntese viral, conseqüência do aumento da adsorção e da síntese de RNA viral. Este polímero interage inespecificamente com múltiplas cargas negativas da superfície da célula, alterando a distribuição destas cargas e elevando o número de cargas positivas, o que aumenta a interação efetiva com o VSV. Esta afirmação vai de encontro à idéia de que, para haver infecção, é necessária interação do vírus com moléculas específicas da superfície da célula. Interações eletrostáticas seriam, na verdade, as responsáveis pela adsorção (BAILEY, MILLER & LENARD, 1984).

O aumento da sensibilidade de células BHK-21 suplementadas com DEAE-D foi igualmente observado em estudo que avaliou o isolamento do vírus rábico de rua em amostras de saliva de animais suspeitos. Células suplementadas com DEAE-D foram capazes de detectar 28 amostras positivas, dentre 48 testadas, enquanto que na ausência do polímero, apenas 18 amostras foram positivas (LARGUI et al, 1975).

HUMMELER, KOPROWSKI & WIKTOR (1967) atribuem à utilização de DEAE-D no momento da infecção, o acréscimo no número de partículas virais detectadas, por IFD, no citoplasma de células BHK-21 inoculadas com amostras de vírus rábico fixo. Os autores relatam, ainda, que modificações no citoplasma celular podiam ser notadas de 8 a 9 horas após a infecção com a utilização do DEAE-D, enquanto que em sua ausência esse período aumentava para 24 a 48 horas.

A utilização de DEAE-D, na concentração de 25 µg/mL de suspensão de células neuroblastoma (N2A), em um experimento que avaliou amostras forte e fracamente positivas à IFD, gerou apenas um pequeno aumento na susceptibilidade celular, mas mostrou-se particularmente importante naquelas amostras consideradas fracamente positivas (CARVALHO, 2001). Da mesma forma, RUDD & TRIMARCHI (1989) revelam que a utilização de dextrano, na concentração final de 25 µg/mL, não gerou diferença no *endpoint* das células neuroblastoma (NA-C1300), mas foi capaz de aumentar a taxa de infecção.

Técnicas para isolamento de amostras de vírus rábico de rua já estão bem desenvolvidas e são amplamente utilizadas para o diagnóstico da raiva. Em alguns laboratórios, o teste de inoculação em cultura de tecido (TICT) para o diagnóstico da raiva já substituiu a IC de camundongos desmamados. O TICT é relativamente fácil de executar, muito mais barato que a IC (até 5 vezes) e, mais importante, pode reduzir substancialmente o tempo necessário para obtenção dos resultados, de 30 dias necessários à IC de camundongos desmamados, para 4 dias no TICT (WEBSTER & CASEY, 1996).

Células neuroblastoma (NA-C1300) são amplamente utilizadas em investigações sobre o vírus rábico, sendo as NA-C1300 especialmente úteis, uma vez que dividem grande número de características com os neurônios humanos (KING, 1996). Segundo CLARK (1980), células neuroblastoma (NA-C1300) infectadas com diferentes concentrações de vírus rábico produziram títulos

consideravelmente mais altos do que células L de camundongo (fibroblasto de camundongo não transformado) e células CB13 (derivadas de cérebro bovino).

O TICT em células neuroblastoma (NA-C1300) mostrou-se pelo menos tão sensível quanto a IC de camundongos desmamados, em experimento que avaliou o isolamento de amostras do vírus rábico de rua. Para espécimes com baixa concentração do vírus, o TICT mostrou-se consideravelmente mais sensível, detectando quatro positivos, dentre 3800 espécimes que foram dados como negativos à IFD e à IC (WEBSTER, 1987).

Da mesma forma, CARVALHO (2001), comparando o isolamento de amostras do vírus rábico de rua em cultivo de células neuroblastoma (N2A) e camundongos desmamados, encontrou maior sensibilidade no teste *in vitro*. No mesmo estudo, a inoculação de amostras contendo baixo título viral ratifica a superior susceptibilidade das células N2A, em relação a camundongos desmamados.

Segundo a OMS, células neuroblastoma (NA-C1300) são mais susceptíveis ao vírus rábico de rua do que qualquer outra célula já testada, sendo, no mínimo, tão eficientes quanto os camundongos desmamados ao isolamento de pequenas quantidades de vírus, além de reduzir o período exigido para completar o teste. Quando comparado à IFD, que é a técnica padrão ouro, a sensibilidade do isolamento em células neuroblastoma chega a mais de 98%. Porém, espécimes em decomposição podem gerar falso-negativos (WHO, 2005b).

Em geral, nenhum efeito citopatológico claramente definido acompanha a produção de vírus rábico em células. Em monocamadas de células BHK-21 infectadas, por exemplo, as células simplesmente começam a “envelhecer” e desprender mais rapidamente da superfície de crescimento do que células controle não infectadas (KING, 1996).

Em contraste, alguns autores se referem à ocorrência de alterações em cultivos celulares após a infecção pelo vírus rábico. Em células McCoy, tanto vírus fixo quanto de rua causaram mudanças citopatológicas de 24 a 72 horas após infecção (KING, 1996). Células CER apresentaram indução de efeito citopático por amostras de vírus rábico, geralmente nas primeiras passagens (SMITH et al, 1977). Da mesma forma, a replicação das amostras Flury HEP (*High Egg Passage*) e ERA (*Evelyn Rokitniki Abelseth*) de vírus rábico em células neuroblastoma (NA-C1300) foi acompanhada de efeito citopático marcante, caracterizado por picnose e morte celular, de forma que o efeito citopático

induzido pelo vírus rábico em células NA foi muito mais severo do que o induzido em células BHK-21 (CLARK, 1980).

A aplicação da análise morfométrica de células McCoy inoculadas com fluido cerebrospinal de paciente acometido de raiva, evidenciou efeito citopático 120 horas após a inoculação. Além disso, foram notadas alteração na atividade do retículo endoplasmático, aumento da permeabilidade das células com formação de “células gigantes” e aumento do título viral (NOGUEIRA, 1998).

HUMMELER, KOPROWSKI & WIKTOR (1967) relatam o surgimento de elementos estruturais estranhos na progênie viral, após a incubação de células BKH-21, infectadas com amostras de vírus fixos por extenso período de tempo. Segundo os autores, a síntese destes elementos começou a ser notada após um período de 72 horas de incubação, e tornou-se mais evidente com o passar dos dias, sugerindo a ocorrência de algum tipo de interferência na ordem dos processos de síntese viral.

A infecção persistente de células BHK-21 (S13) pelo vírus rábico, por mais de 4 anos foi relatada por WILD & BIJLENGA (1981). Os autores revelam que alterações discretas puderam ser notadas a partir da 10ª passagem. Na 20ª passagem, modificações em determinadas proteínas foram encontradas, e próximo à 200ª passagem não era mais possível detectar vírus infectante no meio. Após a 300ª passagem, nenhuma partícula viral era detectada.

TUFFEREAU, LAFAY & FLAMAND (1985), após infecção persistente de células BHK-21 com vírus CVS, durante 2 a 5 anos, observaram redução de aproximadamente 90% na produção de proteínas virais M e G, o que, segundo os autores, explicaria a sobrevivência das células à infecção persistente.

A IFD se tornou a técnica de escolha para o acompanhamento do progresso da infecção em cultivo celular. Em células fixadas, o antígeno predominantemente corado é a nucleoproteína (proteína N) do nucleocapsídeo, enquanto que a coloração de células não fixadas revela principalmente a glicoproteína (proteína G) do vírus, localizada na membrana plasmática da célula. Apesar de a IFD ser uma técnica confiável e sensível para demonstração da presença do vírus rábico em células, ela não oferece uma medida da quantidade de vírus infecciosos nas células ou de seu potencial de liberação de vírus para o meio de cultura (KING, 1996).

Devido a legislações locais e regionais que exigem a implantação do sistema de cultura de células em laboratórios aptos, substituindo o uso de animais

de laboratório pelo uso de células, o teste de IC em camundongos vem sendo progressivamente substituído pela cultura de células na Europa e Estados Unidos. Contudo, a IC provavelmente continuará sendo um importante método confirmatório em países em desenvolvimento. Alguns laboratórios já instituíram o uso de sistemas de cultivo celular como técnica de isolamento do vírus da raiva, em substituição à IC de camundongos desmamados (WOLDEHIWET, 2005). No entanto, a OMS adverte que, quando o cultivo celular não estiver disponível, a inoculação de camundongos, que é uma técnica sensível e específica, deve ser utilizada (WHO, 2005b).

A técnica de isolamento do vírus rábico em cultura de células neuroblastoma (NA-C1300) foi oficialmente adotada no Laboratório do Instituto de Pesquisas de Doenças Animais do Canadá, em substituição à IC de camundongos desmamados, desde 1986 (WEBSTER, 1987).

O Centro Nacional de Referência para Raiva da França igualmente substituiu a IC pelo TICT em células neuroblastoma murino (N2A), desde 1982 (BOURHY et al, 1989).

Da mesma forma, o Laboratório de Diagnóstico de Raiva do Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque substituiu a técnica de IC de camundongos desmamados pelo TICT em células neuroblastoma (NA-C1300), como procedimento de apoio à IFD na rotina de diagnóstico da raiva, após longo período de experiência com TICT e IC de camundongos em paralelo, onde foi avaliada, além da sensibilidade do teste *in vitro*, a praticidade do mesmo (RUDD & TRIMARCHI, 1989).

#### 1.2.1.4.1. Cultivo celular

A cultura de tecidos foi idealizada no início do século XX (FRESHNEY, 1987a) como um método para o estudo do comportamento de células animais livres de variações sistêmicas que pudessem ocorrer no animal devido à homeostase ou ao estresse do experimento (RIZZO, TUCHIYA & MARTINEZ, 1983).

Ross Harrison, acompanhando a diferenciação de células de pedaços de tubo neural de rã, demonstrou que a função normal continuava *in vitro*, marcando assim o verdadeiro início da cultura celular. Depois disso, várias técnicas foram estabelecidas, até que as técnicas de cultura de tecidos de anfíbios foram adaptadas aos tecidos de animais homeotermos, cujo desenvolvimento normal e patológico é próximo ao humano. Nestes termos, descobriu-se a importância do plasma sanguíneo como meio de cultura (RIZZO, TUCHIYA & MARTINEZ, 1983). Os meios para crescimento das células são geralmente suplementados com soro. O soro fetal bovino é um dos mais utilizados devido à alta concentração de fatores de crescimento embrionário (BUTLER, 1992b).

O acesso a diferentes tecidos fez do embrião de galinha a escolha favorita, até que o desenvolvimento de linhagens geneticamente puras de roedores, deixou os mamíferos em primeiro plano. Enquanto o embrião de galinha oferecia uma diversidade de tipos celulares em cultivo primário, tecidos de roedores tinham a vantagem de produzirem células de linhagem contínua (FRESHNEY, 1987a).

A partir dos anos 40, as culturas celulares passaram a ter papel importante no diagnóstico das viroses. Anteriormente, embora usada para a detecção de vírus, a técnica não era amplamente reconhecida e aceita. Isso só aconteceu quando Enders, Weller & Robbins, em 1948, demonstraram que o Poliovírus tipo 2 podia replicar-se em cultura de tecidos embrionários humanos, determinando um efeito citopatogênico facilmente observado nas culturas infectadas, o qual podia ser bloqueado pelo uso de soro-imune específico (RIZZO, TUCHIYA & MARTINEZ, 1983).

Em 1947, Earle et al desenvolveram a técnica de cultivo de células animais em monocamadas sobre superfície sólida, usando meio de cultura líquido. O método é simples, serve tanto para células de linhagem como para células primárias, e permite estudo minucioso das células, que aderem à superfície sólida, achatam-se e multiplicam-se até formarem o que se costuma chamar de tapete celular ou camada contínua, que é, geralmente, uniestratificada (RIZZO, TUCHIYA & MARTINEZ, 1983).

O padrão característico de desenvolvimento das células, *in vitro*, compreende uma fase *lag*, na qual ocorre adaptação e início da proliferação celular; uma fase *log*, onde há o aumento exponencial do número de células; e

uma fase estacionária ou *plateau*, na qual a cultura se torna confluyente e sua taxa de crescimento é reduzida ou cessa (FRESHNEY, 1987b).

**Células BHK-21** - As células BHK-21 são células do tipo fibroblástica, alongadas, obtidas originalmente de culturas de rins de hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) de um dia de vida. As culturas primárias de onde as células BHK-21 derivam foram preparadas em março de 1961, a partir de rins de cinco hamsters de um dia de vida, da ninhada N° 21. O clone 13 (ou C 13), foi originado de células individualizadas, que cresceram em pequenas gotas de meio, sob óleo mineral. Esta é a fonte da maior parte das células BHK-21 distribuídas pela Unidade de Pesquisa Experimental do Instituto de Virologia, da Universidade de Glasgow, onde toda a pesquisa foi realizada. O cariótipo das células BHK-21 é o de hamster sírio macho, e permaneceu o mesmo em BHK-21 (C13) por pelo menos 450 gerações (STOKER & MACPHERSON, 1964).

A linhagem celular BHK-21 (C13) é bastante utilizada, sendo capaz de replicar uma ampla variedade de vírus, dentre os quais os vírus da febre aftosa, da raiva, do herpes simples, da pseudorraiva, da rinotraqueíte bovina e da estomatite vesicular (STOKER & MACPHERSON, 1964).

As linhagens celulares têm várias vantagens sobre os cultivos primários: propagam-se com maior facilidade, podem ser caracterizadas para se comprovar que estão livres de contaminantes e podem ser mantidas congeladas para serem utilizadas muito tempo depois (WIKTOR, 1976). Células estocadas em meio contendo glicerina ou dimetilsulfóxido (DMSO) podem ser reativadas com alta viabilidade após longos períodos a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (STOKER & MACPHERSON, 1964).

O Meio Mínimo Essencial de Glasgow (G-MEM), originalmente desenvolvido para o crescimento de células BHK-21 (C13), é uma modificação do meio básico de Eagle, e possui o dobro da concentração de aminoácidos e vitaminas e maior concentração de glicose e bicarbonato (BUTLER, 1992a).

A maioria dos métodos convencionais de propagação de vírus pode ser utilizada para propagação do vírus rábico em cultivo de células BHK-21. Monocamadas em fase estacionária ou de crescimento e culturas em suspensão têm sido utilizadas com sucesso (KING, 1996).

#### 1.2.1.5. *Rapid rabies enzyme immunodiagnostic*

Inicialmente desenvolvido para titulação de anticorpos neutralizantes para raiva, o teste de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) foi aplicado para quantificação de antígeno rábico por Atanasiu, 1977, utilizando imunoglobulina G (IgG) anti-nucleocapsídeo purificado marcado com fluoresceína (MESLIN & KAPLAN, 1996).

Em 1986, Perrin et al. desenvolveram um teste de ELISA denominado RREID (*Rapid rabies enzyme immunodiagnostic*), baseado na detecção do antígeno nucleocapsídeo do vírus rábico no tecido cerebral (BOURHY et al, 1989). Nesta técnica, microplacas são cobertas com IgG purificada e um conjugado IgG-peroxidase é usado para reagir com o antígeno imunocapturado. Pode ser utilizada para investigar tecidos parcialmente decompostos para evidenciar infecção por raiva, mas não pode ser utilizada para espécimes que tenham sido fixados em formalina (MESLIN & KAPLAN, 1996).

Uma vez que a reação que indica a presença do antígeno pode ser visualizada a olho nu, o teste pode ser realizado em laboratórios desprovidos de equipamento para IFD (MESLIN & KAPLAN, 1996). Porém, devido à sua sensibilidade ser mais baixa, não deve ser utilizado em substituição à técnica de IFD (MESLIN & KAPLAN, 1996; BOURHY et al, 1989).

#### 1.2.1.6. Aglutinação em látex

KASEMPIMOLPORN et al (2000) relataram a utilização da técnica de Aglutinação em látex, para detecção do antígeno rábico em amostras de saliva de cães. Segundo os autores, é um método simples, barato e econômico, que apresentou sensibilidade e especificidade de 95,2 e 98,7%, respectivamente.

### 1.2.1.7. Técnicas moleculares

Os avanços registrados em biologia molecular possibilitaram, em 1981, o relato da primeira seqüência dos genes do vírus rábico e estabeleceram as bases para a classificação definitiva do vírus mediante a análise antigênica comparativa, assim como identificação da estrutura molecular e codificação do genoma viral (GERMANO, 1994).

DAVID et al (2002) utilizaram a técnica de RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*), na detecção do vírus rábico em cérebros em decomposição de animais naturalmente infectados, e encontraram amostras positivas à RT-PCR, que foram falso-negativas à IFD, IC de camundongos desmamados e TICT de células neuroblastoma. Porém, os autores advertem que existe a possibilidade de a amostra estar deteriorada a ponto de não ser mais adequada à extração do RNA e, neste caso, em termos de saúde pública, uma amostra RT-PCR negativa perde a sua importância, pois não pode ser utilizada como ferramenta para tomada de decisões.

Um protocolo para detecção do vírus rábico pelo método de RT-PCR foi proposto por DANTAS JUNIOR et al (2004). Os autores destacam como vantagens da técnica em relação à IFD e ao uso de camundongos, a possibilidade de utilização de espécimes em más condições de conservação (em decomposição) e a maior rapidez de conclusão em relação à IC de camundongos desmamados.

Segundo a OMS, ainda são necessários investimentos no delineamento de *primers*, e aperfeiçoamento das técnicas como o *Real Time* RT-PCR e o *nested* PCR, embora o uso da PCR e outras técnicas de amplificação não seja recomendado para o diagnóstico de rotina *post-mortem* da raiva. Contudo, estes métodos moleculares podem ser aplicados em estudos epidemiológicos em laboratórios onde haja rigoroso controle de qualidade dos procedimentos e que possuam experiência e perícia nestas técnicas (WHO, 2005b).

### 1.2.2. Diagnóstico *intra vitam* da raiva

O diagnóstico *intra vitam* da raiva para humanos e animais, é possível através da detecção do antígeno rábico, por IFD, em amostras de saliva ou líquido cerebrospinal, biópsia de folículo piloso e impressão de córnea de pacientes doentes (DEAN, ABELSETH & ATANASIU, 1996).

LARGUI, et al (1975), utilizando cultivo de células BHK-21, isolaram vírus em saliva de apenas 28 animais, dentre 48 positivos em SNC, e alertam que o resultado negativo em saliva não exclui a doença. DELPIETRO, LARGUI & RUSSO (2001) avaliaram a infecciosidade de amostras de saliva de bovinos coletadas *post mortem*, através da inoculação intracerebral em camundongos desmamados. Neste experimento, o isolamento do vírus rábico foi obtido em somente 1,6% das amostras de saliva dos animais cujos cérebros foram positivos.

A inoculação de líquido cerebrospinal de pacientes suspeitos de raiva, em cultivo de células McCoy mostrou-se um método útil para o diagnóstico laboratorial *intra vitam* da raiva (NOGUEIRA, 1998).

CREPIN et al (1998) analisaram a sensibilidade dos métodos de IFD e RT-PCR, no diagnóstico *intra vitam* da raiva em humanos. Segundo seus resultados, a IFD de biópsia de folículo piloso apresentou a maior sensibilidade (86%), seguida pela RT-PCR de saliva (30%). Os autores relatam que estas duas técnicas combinadas permitiram o diagnóstico *intra vitam* dos nove casos de raiva humana confirmados laboratorialmente, *post mortem*.

Resultados positivos para raiva por IFD de folículo piloso já foram observados em considerável número de pacientes durante a fase inicial da doença (WHO, 2005b). Contudo, o resultado negativo não é conclusivo (WOLDEHIWET, 2002). A biópsia é realizada na área da nuca, com folículos pilosos contendo nervos periféricos. O exame de pelo menos 20 secções é necessário para detectar inclusões de nucleocapsídeo em nervos ao redor da base do folículo piloso (WHO, 2005b). Esta técnica pode também ser utilizada para diagnóstico *post mortem* em países onde a abertura do crânio de pessoas mortas não é aceita por questões culturais e religiosas (MESLIN & KAPLAN, 1996).

O diagnóstico *intra vitam* da raiva por IFD de impressão de córnea foi descrito pela primeira vez por Schneider, em animais, em 1969, e por

Cifuentes, Calderon & Biglenga, em humanos, em 1971. Contudo, um estudo sobre a confiabilidade das impressões de córnea para o diagnóstico da raiva mostrou que, especialmente quando a amostra é coletada sob condições de campo, um resultado negativo não exclui a doença (MESLIN & KAPLAN, 1996). A OMS não recomenda este exame por não considerá-lo seguro (WHO, 2005b).

A sensibilidade das técnicas de diagnóstico *intra vitam* varia bastante de acordo com o estágio da doença, o nível de anticorpos, a natureza intermitente da liberação do vírus e do treinamento da equipe técnica envolvida (WHO, 2005b).

### 1.3. VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A raiva possui muitas interfaces entre os seres humanos e os outros animais. Portanto, a vigilância epidemiológica da doença guarda estreita relação entre o tratamento de pessoas expostas e as atividades de controle da raiva animal. A ênfase unilateral (ou na área humana ou na animal) leva à ausência de percepção dos determinantes da doença e, conseqüentemente, à perda da qualidade das intervenções (BRASIL, 2002).

De acordo com o Artigo 3º da Lei nº 8.080/90, estão diretamente ligadas à saúde, ações que se destinam a garantir às pessoas e à coletividade condições de bem-estar físico, mental e social. Segundo o Artigo 5º da mesma Lei, dentre os objetivos do Sistema Único de Saúde (SUS), está prevista “a assistência às pessoas por intermédio de ações de promoção, proteção e recuperação da saúde, com a realização integrada das ações assistenciais e das atividades preventivas”. A execução de ações de vigilância epidemiológica está prevista, de acordo com o Artigo 6º, no campo de atuação do SUS (BRASIL, 1990).

SUREAU (1988), enfatiza que nenhum procedimento válido pode ser iniciado em relação à prevenção da raiva sem que haja um diagnóstico laboratorial rápido e seguro, considerado a “pedra angular” de qualquer providência veterinária e da determinação da necessidade do tratamento anti-rábico pós-exposição.

A raiva humana é uma doença de notificação compulsória, segundo a Portaria nº 1.984, de 25 de outubro de 2001 (BRASIL, 2001a) e a Portaria nº 1.943, de 18 de outubro de 2001 (BRASIL, 2001b), ambas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A Resolução RDC nº 347, de 02 de dezembro de 2003, regulamenta que não podem ser disponibilizados para transplante ou enxerto tecidos retirados de doadores cuja *causa mortis* tenha sido a raiva, ou cuja causa da morte seja desconhecida (BRASIL, 2003).

No ano de 2004, nos Estados Unidos da América (CDC, 2004a; CDC, 2004b), e em 2005, na Alemanha (BBC NEWS, 2005), foram notificados pelo menos 5 casos de raiva humana transmitida por transplante de órgãos de pacientes raivosos não diagnosticados. Este fato deixa clara a necessidade de maior preocupação com as formas de transmissão da raiva, assim como de manter alerta todas as classes profissionais envolvidas.

O controle da raiva canina deve incorporar três elementos básicos: vacinação animal em massa, controle da população canina e vigilância epidemiológica (WHO, 2005b).

As atividades de vigilância epidemiológica envolvem o tratamento de pessoas expostas e medidas de controle dos animais transmissores, envolvendo busca ativa de agredidos, bloqueio vacinal canino e felino, captura de cães errantes e monitoramento da circulação viral através de envio de amostras animais para análise laboratorial. Em caso de morcegos hematófagos, deve-se realizar captura e controle populacional, além de envio de amostras para análise laboratorial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005c).

A implantação de procedimentos-padrão, equipamentos e reagentes apropriados ao diagnóstico da raiva é geralmente escassa, e a quantidade de testes confirmatórios em humanos e animais em algumas regiões é muito pequena. Técnicas melhoradas para obtenção de um diagnóstico rápido e econômico, sem perda de sensibilidade e especificidade, devem ser incentivadas (WHO, 2005b).

A saúde é um direito fundamental assegurado por lei a todo ser humano, sendo o Estado responsável por prover as condições indispensáveis ao seu pleno exercício. Estão diretamente ligadas à saúde, dentre outros, ações que tenham por objetivo garantir às pessoas e à coletividade condições de bem-estar físico, mental e social (BRASIL, 1990).

## 2. OBJETIVOS

- Comparar as técnicas de inoculação intracerebral em camundongos e de inoculação em cultura de células BHK-21 (C13), no isolamento do vírus rábico de rua.

- Comparar a sensibilidade e a especificidade de três sistemas de isolamento do vírus rábico de rua, através da titulação simultânea em:

Células BHK-21 (C 13);

Camundongos lactentes;

Camundongos desmamados.

- Avaliar qual sistema oferece melhor resultado no isolamento do vírus rábico de rua, considerando segurança e rapidez, possibilitando redução do período necessário à conclusão do diagnóstico da raiva.

### 3. METODOLOGIA

A presente pesquisa foi realizada na Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”, pertencente à Superintendência de Controle de Zoonose, Vigilância e Fiscalização Sanitária, órgão da Secretaria Municipal de Saúde da prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro (S/SCZ-IJV).

As amostras de vírus fixo e de células BHK-21 (C13) foram gentilmente cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

#### 3.1. VÍRUS FIXO

Uma amostra do vírus PV (Pasteur Virus) adaptado ao cultivo celular, foi replicada em células BHK-21 (C 13) e mantida liofilizada no Laboratório de Diagnóstico de Raiva, conservada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , parte como “Vírus semente” e parte como “Vírus trabalho”.

Como controle positivo das inoculações realizadas em células, foi utilizado o “Vírus trabalho”. Este foi submetido à titulação em células BHK-21, para o cálculo de sua  $\text{DICT}_{50}$  (Dose infecciosa em cultura de tecido 50%).

#### 3.2. AMOSTRAS DE CAMPO

Foram analisadas 28 amostras de Sistema Nervoso Central de diferentes espécies animais, sendo:

- Dezoito amostras “Positivas para Raiva”: 14 bovinos, 3 eqüinos e 1 ovino.

- Dez amostras “Negativas para Raiva”: 1 ovino, 1 eqüino, 1 bovino, 2 felinos e 5 caninos.

As amostras eram provenientes de vários municípios do Estado do Rio de Janeiro. Todas foram recebidas e diagnosticadas pela Seção de Diagnóstico de Raiva, através das técnicas de IFD e IC de camundongos lactentes, e estavam estocadas no laboratório a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3. ANIMAIS DE LABORATÓRIO

No presente experimento, foram utilizados camundongos suíços albinos (*Mus musculus*), provenientes de colônia convencional, mantida pelo Setor de Biotério do Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”.

a) Para cada amostra positiva foram utilizados:

- Dez ninhadas contendo, cada uma, 16 camundongos lactentes, entre 1 e 3 dias de vida;
- Cinco grupos formados, cada um, por 8 camundongos desmamados, de 21 dias de vida.

b) Para cada amostra negativa foi utilizada uma ninhada contendo 16 camundongos lactentes, entre 1 e 3 dias de vida.

### 3.4. CÉLULAS BHK-21 (C 13)

Uma amostra de células BHK-21 (C 13) (ATCC: CCL-10), foi cultivada no Laboratório de Diagnóstico de Raiva e, após a obtenção de grande volume, as células foram congeladas em criotubos no volume de 1 mL, à concentração de  $2,8 \times 10^6$  células/mL, e mantidas como Banco de Células, em nitrogênio líquido ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Permaneceram estocadas desta forma até o momento de sua utilização, quando um criotubo era descongelado e as células cultivadas em garrafas de polietileno, de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> (Corning<sup>®</sup>), em Meio Mínimo Essencial de Glasgow, suplementado com Penicilina a 50 UI/mL e Estreptomicina a 0,05 mg/mL (Solução de Penicilina-Estreptomicina SIGMA<sup>®</sup>), Fungizona a 0,42 mg/L, glutamina 0,3 mg/mL e Soro Fetal Bovino a 10% (concentrações finais) (G-MEM).

Depois de descongeladas, as células foram utilizadas no experimento por um período de até 10 passagens, sendo, então, descartadas.

### 3.5. PREPARO DAS DILUIÇÕES

Fragments de corno de Ammon, córtex e cerebelo foram pesados, triturados em gral e diluídos a 10% (diluição 10<sup>-1</sup>), segundo o protocolo da Organização Mundial de Saúde (KOPROWSKI, 1996).

Esta suspensão foi submetida à centrifugação durante 15 minutos, a 200 x g e temperatura de 4 °C, em centrífuga JOUAN MR 22i, rotor SWM 180.5.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e submetido a diluições decimais seriadas, até 10<sup>-5</sup>, no caso das amostras positivas, e até 10<sup>-2</sup>, no caso das amostras negativas. Para todas as diluições utilizou-se G-MEM.

Cada diluição foi, então, dividida em duas alíquotas: uma para a inoculação dos camundongos, e outra para inoculação em culturas de células BHK-21. No momento da inoculação do cultivo celular, um frasco contendo o vírus PV liofilizado foi reconstituído com um volume de 3 mL do meio de cultivo celular. Esta foi a diluição utilizada nos poços referentes ao controle positivo.

Todo o procedimento foi realizado em Câmara de Segurança Biológica classe IIA, com as suspensões mantidas em banho de gelo durante todo o tempo.

A inoculação dos camundongos foi realizada sempre imediatamente após a inoculação das células.

### 3.6. INOCULAÇÃO DAS CÉLULAS BHK-21

Para a titulação das amostras em cultivo em monocamadas de células BHK-21 foram utilizadas microplacas de fundo reto de 96 poços, da marca Falcon®.

Para o preparo das placas, foram tripsinizadas células BHK-21, mantidas em garrafas plásticas de 75 cm<sup>2</sup>, em estufa a 37 °C por 24 a 48 horas, apresentando tapete confluyente.

Uma alíquota foi tomada, misturada ao corante azul de Tripán, e contada em câmara de Neubauer (DAWSON, 1992). A concentração de células foi, então, ajustada, acrescentando G-MEM, de forma a apresentar de 2,5 a 3,0 x 10<sup>5</sup> células por mL de suspensão.

Imediatamente antes da inoculação nas placas, foi acrescentado DEAE-D à suspensão de células, de forma a atingir uma concentração final do polímero igual a 50 µg/mL (RUDD, TRIMARCHI & ABELSETH, 1980).

A suspensão de células foi, então, semeada nos 96 poços das placas de fundo reto, no volume de 100 µL para cada poço (WEBSTER & CASEY, 1996).

#### 3.6.1. Amostras positivas

Para cada amostra positiva, foram preparadas 3 placas de 96 poços.

Imediatamente após a colocação das células nos poços, foi adicionada a suspensão de vírus, em um volume de 200 µL por poço (WEBSTER & CASEY, 1996). Foram inoculados 16 poços de cada placa para cada diluição.

Três poços da coluna de número 11 funcionaram como controle negativo, e nestes foram acrescentados, ao invés da suspensão de vírus, 200 µL de G-MEM.

Outros três poços da coluna de número 12 funcionaram como controle positivo, e nestes foram acrescentados 200 µL de vírus PV.

As três placas foram cobertas com filme adesivo sensível à pressão Falcon<sup>®</sup>, e tampadas com tampa própria, de forma a impedir a troca gasosa.

As placas foram acomodadas em estufa e mantidas à temperatura de 34 °C, durante uma hora (RUDD, TRIMARCHI & ABELSETH, 1980).

Após este período, foram retiradas da estufa e o meio com DEAE-D removido. Foi, então, acrescentado 200 µL de G-MEM novo (RUDD, TRIMARCHI & ABELSETH, 1980).

As três placas voltaram à estufa acondicionadas da mesma forma supracitada, onde foram mantidas por períodos diferentes: a primeira por 48 horas, a segunda por 72 horas e a terceira por 96 horas, observando-se, diariamente, o crescimento e as características morfológicas das células.

### **3.6.2. Amostras negativas**

Uma placa foi preparada para a inoculação de cada cinco amostras negativas.

Foi seguido o mesmo protocolo utilizado na inoculação das amostras positivas, sendo que cada diluição foi inoculada em apenas 8 poços da placa. Foram testadas somente as diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ . Uma única leitura foi realizada, após 96 horas.

### **3.7. INOCULAÇÃO DOS CAMUNDONGOS**

Para cada uma das 18 amostras positivas analisadas, foram inoculados:

a) Cinco ninhadas de camundongos lactentes, uma para cada diluição, que foram observadas durante 7 dias – Grupo I;

b) Cinco ninhadas de camundongos lactentes, uma para cada diluição, que foram observadas durante 21 dias – Grupo II;

c) Cinco grupos formados por camundongos desmamados, um grupo para cada diluição, que foram observados durante 21 dias – Grupo III.

Na avaliação das amostras negativas, apenas a diluição  $10^{-1}$  foi inoculada em uma ninhada de camundongos lactentes, observada por 7 dias.

Camundongos lactentes e desmamados foram inoculados, respectivamente, com 0,02 mL e 0,03 mL de cada diluição, no hemisfério esquerdo do cérebro (SUREAU, RAVISSE & ROLLIN, 1991). As suspensões foram mantidas, durante todo o procedimento, em banho de gelo.

Todos os camundongos inoculados foram mantidos em gaiolas apropriadas, no infectório da Seção de Diagnóstico de Raiva, durante todo o período de observação, com ciclo de 12 horas de claro e escuro e com água e ração *ad libitum*, à temperatura média de 20 °C. Os animais foram observados diariamente.

### 3.8. IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

#### 3.8.1. Conjugado anti-rábico

Para o exame de IFD de camundongos e células, utilizou-se conjugado marcado por Isoticianato de Fluoresceína, preparado no próprio laboratório, a partir do soro de coelhos hiperimunizados com vacina preparada com vírus CVS.

### **3.8.2. Imunofluorescência Direta em Cultivo Celular**

Após o período de incubação correspondente a cada placa (48, 72 ou 96 horas), o meio de crescimento foi completamente removido. As células foram, então, fixadas durante 30 minutos a 4 °C com solução de acetona 80% conservada a -20 °C. Após a fixação, retirou-se totalmente a acetona e deixou-se que a placa secasse ao ar. Depois de seca, foi acrescentado em cada poço 60 µL de conjugado. A placa foi, então, levada à estufa, em câmara úmida, onde permaneceu durante 30 minutos, a 37 °C. Seguiram-se três lavagens com salina tamponada fosfatada (PBS), pH 7,8 (WEBSTER & CASEY, 1996).

Após este procedimento, a placa foi examinada em microscópio invertido de imunofluorescência Olympus CK 40, em objetiva 20x fluorita LWD CA20PL 0,40 160/1.2 e, quando necessário, objetiva de 40x LWD CDPlan 40 FPL 0.55 160/1.

### **3.8.3. Imunofluorescência Direta em Camundongos**

Decorridos os sete dias de observação do Grupo I, todos os camundongos foram sacrificados por inalação contínua de Halotano (anestésico inalatório halogenado), e seus cérebros examinados por IFD. Neste grupo, aqueles animais que morreram entre o quarto e o sétimo dias foram igualmente submetidos à IFD (SILVA, 2000).

No Grupo II, os animais que adoeceram e morreram a partir do quarto dia pós-inoculação (PI), tiveram seus cérebros coletados e submetidos à IFD (KOPROWSKI, 1996).

Para o exame de IFD dos camundongos, coletou-se o hemisfério contra-lateral à inoculação para preparação de impressão em lâminas de microscopia, de acordo com KOPROWSKI (1996). Cada impressão foi demarcada, e coberta com conjugado anti-rábico.

As lâminas foram incubadas durante 30 minutos, a 37°C, em câmara úmida. Seguiram-se três lavagens com PBS, pH 7,8 (KOPROWSKI, 1996).

Após este procedimento, as impressões foram observadas em microscópio de imunofluorescência Olympus BX 51, com epi-iluminação, em objetiva de 40x fluorita 40 x/0.75 PhZ  $\infty$ /0.17 UplanFI, filtro UMWB.

No Grupo III, os animais que adoeceram e morreram a partir do sétimo dia PI, foram considerados positivos para raiva (KOPROWSKI, 1996; SILVA, 2000).

### 3.9. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E DA ESPECIFICIDADE

A sensibilidade dos métodos diagnósticos foi apresentada como a proporção de amostras com resultado positivo dentre as amostras verdadeiramente positivas.

A especificidade dos métodos foi apresentada como a proporção de amostras com resultado negativo dentre as amostras verdadeiramente negativas.

### 3.10. DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL<sub>50</sub>), DOSE POSITIVA 50% (DP<sub>50</sub>), E DOSE INFECCIOSA EM CULTURA DE TECIDO 50% (DICT<sub>50</sub>).

a) A DL<sub>50</sub> foi calculada a partir dos resultados obtidos no Grupo III (camundongos desmamados). Os números de camundongos mortos e sobreviventes em cada diluição foram registrados em fichas, e os cálculos realizados segundo o método de REED & MÜENCH (1938).

b) A DP<sub>50</sub> foi calculada para os Grupos I e II (camundongos lactentes), separadamente. Para cada diluição, os números de camundongos positivos e negativos à IFD foram registrados em fichas. Os valores correspondentes a positivos entraram na fórmula (REED & MÜENCH, 1938), no lugar correspondente à mortalidade, e os valores correspondentes a negativos, no lugar correspondente à sobrevivência (SILVA, 2000).

c) A  $DICT_{50}$  (Dose infecciosa em cultura de tecido 50%) foi calculada para o cultivo celular. Para cada diluição, os números de poços positivos e negativos foram registrados em fichas. Os valores correspondentes a positivos entraram na fórmula (REED & MÜENCH, 1938), no lugar correspondente à mortalidade, e os valores correspondentes a negativos, no lugar correspondente à sobrevivência. Na interpretação das placas, a porcentagem de infecção das células e a intensidade da fluorescência foram avaliados, mas não foram considerados para o cálculo da  $DICT_{50}$ . Neste sistema, poços contendo uma ou mais células positivas foram considerados positivos.

Os títulos encontrados em células BHK-21 e camundongos lactentes e desmamados, em cada amostra analisada, foram utilizados como referência para comparação dos sistemas testados no isolamento do vírus da raiva.

### 3.11. ACOMPANHAMENTO DAS CÉLULAS BHK-21 INOCULADAS, APÓS 48, 72 E 96 HORAS.

Os títulos obtidos em cultivo de células BHK-21 (C13) nos três diferentes tempos de leitura das placas de 96 poços inoculadas com as amostras positivas (48, 72 e 96 horas), foram utilizados para estimar o melhor período para obtenção do resultado neste sistema diagnóstico.

### 3.12. APLICAÇÃO DA REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

O teste de regressão linear simples foi aplicado aos valores de  $DICT_{50}$ ,  $DP_{50}$ , e  $DL_{50}$ , obtidos em cada amostra, visando demonstrar se existe correlação linear entre os resultados.

Para todas as análises foi utilizado o Programa Microsoft Excel 2000.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. VÍRUS FIXO

O vírus PV, utilizado como controle positivo no experimento, teve  $DICT_{50}$  igual a  $10^{-4.43}$ . Cada poço controle positivo recebeu 10 000  $DICT_{50}$ , o que levou a praticamente 100% de células infectadas em todas as inoculações realizadas (APÊNDICE - **Figura 1**).

### 4.2. AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS

As 18 amostras analisadas confirmaram-se positivas neste experimento.

Os valores de  $DICT_{50}$  em 48, 72 e 96 horas,  $DP_{50}$  em 7 e 21 dias e  $DL_{50}$ , calculados para as 18 amostras positivas podem ser conferidos no **Quadro1**.

Para a amostra 349/05, não foi possível obter os valores precisos de positividade e mortalidade, devido a uma contaminação extrema que gerou a morte de todos os camundongos, lactentes e desmamados, das diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , assim como perda total das células inoculadas com estas diluições. Porém, foi adotado o valor  $<3$  nas tabelas comparativas, pois na diluição  $10^{-3}$ , foram verificadas células positivas, assim como camundongos lactentes e desmamados positivos.

**Quadro 1: Relação de 18 amostras positivas analisadas, e seus respectivos valores de DICT<sub>50</sub> em 48, 72 e 96 horas, DP<sub>50</sub> em 7 e 21 dias e DL<sub>50</sub>.**

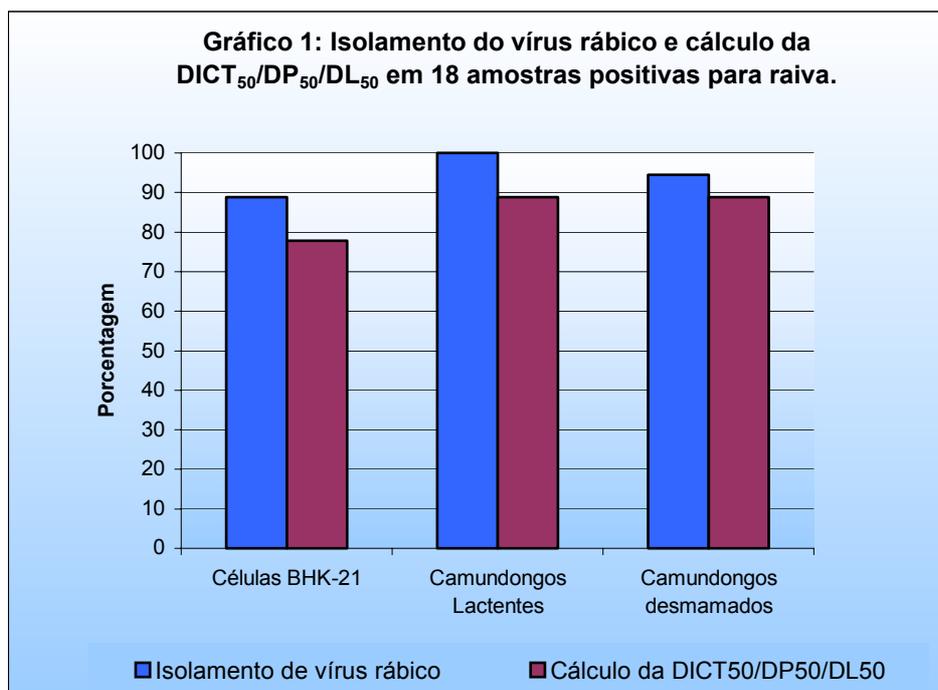
REGISTRO	ESPÉCIE	TÍTULO (log <sub>10</sub> dil <sup>-1</sup> )					
		CÉLULAS BHK-21 (DICT <sub>50</sub> )			CAMUNDONGOS		
		48 h	72 h	96 h	Lactente (DP <sub>50</sub> )		Desmamado (DL <sub>50</sub> ) Grupo III
Grupo I (7 dias)	Grupo II (21 dias)						
800/04	Bovino	nr	3,31	3,16	4,43	4,41	3,72
808/04	Bovino	2,86	3,36	3,51	>5	>5	4,15
719/04	Bovino	<1	1,85	2,46	3,4	2,42	1,5
102/05	Bovino	nd	nd	nd	<1	<1	nd
113/05	Equino	3	3,55	3,54	3,41	3,37	3,29
771/04	Bovino	2,33	3,36	3,21	3,39	2,81	2,59
144/05	Bovino	nd	nd	nd	2,45	2,32	1,5
103/05	Bovino	3,75	4,07	3,75	4,18	4,19	3,9
187/05	Bovino	2,87	3,94	4,5	4,66	4,85	4,43
286/05	Ovino	2,33	2,74	2,62	2,84	3,48	3,59
280/05	Bovino	nd	<1	<1	3,27	3,24	2,8
285/05	Bovino	<1	2	2,51	3	3,46	3,42
364/05	Bovino	3,73	3,95	4,2	4,26	4,5	4,25
378/05	Bovino	<1	3,94	2,56	3,3	2,73	2,67
349/05	Equino	nd	<3	<3	<3	<3	<3
382/05	Equino	2,5	2,93	3,29	3,35	3,5	3,41
333/05	Bovino	1,89	2,53	2,47	2,88	2,87	2,5
399/05	Bovino	4,71	>5	>5	4,23	4,18	4

nr = teste não realizado  
nd = vírus não detectado  
dil. = diluição  
h. = horas

Dentre as 18 amostras, 16 (88, 89%) foram positivas em células BHK-21, 18 (100%) foram positivas em camundongos lactentes, e 17 (94,44%) foram positivas em camundongos desmamados (**Gráfico 1**).

Assim, para as amostras avaliadas, os valores de Sensibilidade foram iguais a 100% para camundongos lactentes, 94,44% para camundongos desmamados e 88,89% para células BHK-21.

Das 18 amostras positivas, foram possíveis os cálculos da DL<sub>50</sub> e DP<sub>50</sub> em 16 amostras (88,89%). A DICT<sub>50</sub> pôde ser calculada em 14 amostras (77,78%) (**Gráfico 1**).



#### 4.2.1. Resultados em cultura de células BHK-21

O crescimento das células foi reduzido ou nulo em poços onde a contaminação foi acentuada (APÊNDICE - **Figura 2**). A diluição  $10^{-1}$  levou à contaminação, com ausência de crescimento celular em mais de 50% dos poços, em 5 materiais (27,78%) positivos. Em 3 (16,67%) desses materiais, foram observados 100% dos poços contaminados.

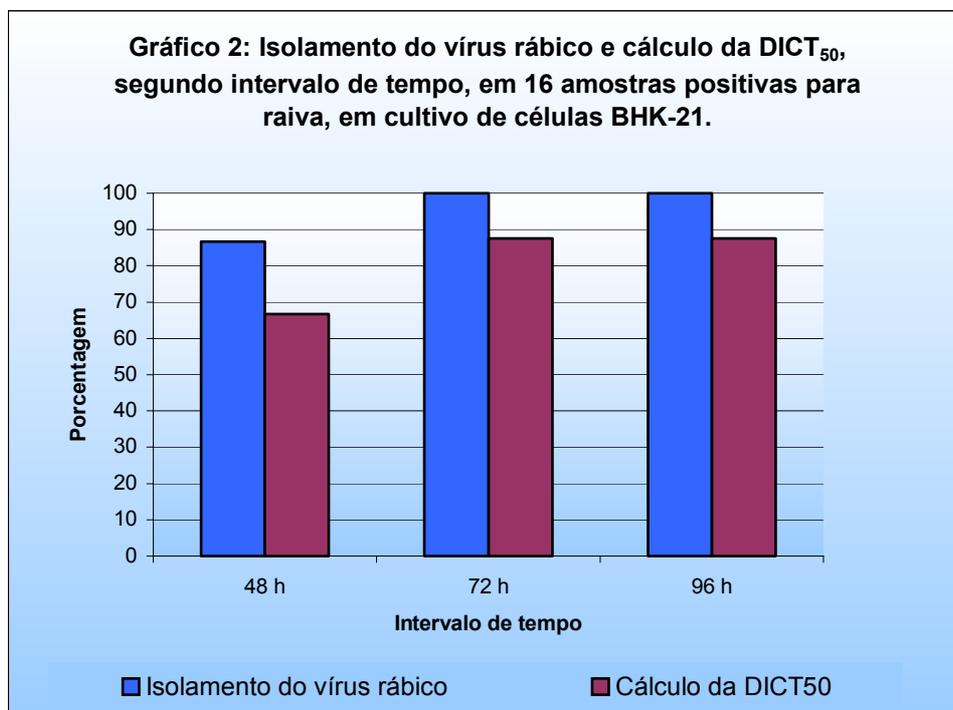
Da mesma forma, foi observada ausência de crescimento da monocamada celular em vários poços da diluição  $10^{-1}$ , ainda que sem evidência macroscópica de contaminação.

Já a diluição  $10^{-2}$ , apesar de gerar contaminação de alguns poços, em nenhuma amostra comprometeu mais de 30% deles.

Quarenta e oito horas PI, já foi possível detectar vírus em 86,87% das amostras (13/15), mas somente 66,67% (10/15) em condições de calcular a  $DICT_{50}$  (**Gráfico 2**).

Todos os 16 materiais (100%) nos quais foi possível o isolamento do vírus rábico em cultivo celular, já evidenciaram sua presença 72 horas PI, sendo

possível o cálculo da  $DICT_{50}$  em 14 amostras (87,50%). Estes valores se repetiram no período de 96 horas PI (**Gráfico 2**).



Na **Tabela 1** constam os resultados das dezesseis amostras nas quais houve isolamento do vírus rábico, assim como os valores de  $DICT_{50}$  das 14 amostras cujos resultados possibilitaram este cálculo.

Quarenta e oito horas PI, os valores da  $DICT_{50}$  foram mais baixos. Não foi constatada grande variação da  $DICT_{50}$  no período de 72 a 96 horas PI (**Tabela1**).

A maior diferença verificada de um intervalo de tempo para outro foi na taxa de infecção das células, principalmente de 48 para 72 horas e, em menor proporção, de 72 para 96 horas. Porém, os resultados da taxa de infecção não foram considerados, uma vez que se optou por estabelecer uma forma qualitativa de análise dos poços onde, na presença de uma ou mais células positivas, o poço foi considerado “Positivo”.

**Tabela 1: Relação das 16 amostras onde foi possível o isolamento do vírus rábico em células BHK-21, com seus valores de DICT<sub>50</sub>, 48, 72 e 96 horas pós-inoculação.**

REG	CÉLULAS BHK-21 – DICT <sub>50</sub> (log <sub>10</sub> dil <sup>-1</sup> )		
	48 h	72 h	96 h
800/04	nr	3,31	3,16
808/04	2,86	3,36	3,51
719/04	<1	1,85	2,46
113/05	3,00	3,55	3,54
771/04	2,33	3,36	3,21
103/05	3,75	4,07	3,75
187/05	2,87	3,94	4,50
286/05	2,33	2,74	2,62
280/05	nd	<1	<1
285/05	<1	2,00	2,51
364/05	3,73	3,95	4,20
378/05	<1	3,94	2,56
349/05	nd	<3	<3
382/05	2,50	2,93	3,29
333/05	1,89	2,53	2,47
399/05	4,71	>5	>5

nr = teste não realizado.

nd = vírus não detectado.

dil. = diluição

h. = horas

A **Figura 3** (APÊNDICE) apresenta células BHK-21 positivas para raiva, após 48, 72 e 96 horas de incubação. Podem ser observadas inclusões arredondadas ou ovais no citoplasma das células, de contorno liso e coloração fluorescente.

#### 4.2.2. Resultados nos Grupos I, II e III

De acordo com os resultados de DP<sub>50</sub> dos grupos I e II e DL<sub>50</sub> do Grupo III, verificamos que em 81% (13/16) das amostras, a DP<sub>50</sub> foi superior à DL<sub>50</sub>. Em uma amostra (Reg. 382/05) estes valores foram considerados iguais. Não foram consideradas as duas amostras (Reg. 102/05 e 349/05) onde os valores não permitiram o cálculo da DP<sub>50</sub> ou DL<sub>50</sub> (**Tabela 2**).

**Tabela 2: Relação de 18 amostras onde foi possível o isolamento do vírus rábico, com seus respectivos valores de DP<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub>, média das DP<sub>50</sub> e a diferença entre a média da DP<sub>50</sub> e a DL<sub>50</sub>.**

REG	DP <sub>50</sub> Grupo I <sup>a</sup>	DP <sub>50</sub> Grupo II <sup>a</sup>	0 DP <sub>50</sub> <sup>a, b</sup>	DL <sub>50</sub> Grupo III <sup>a</sup>	0 DP <sub>50</sub> -DL <sub>50</sub> <sup>a, c</sup>
800/04	4,43	4,41	4,42	3,72	1,05
808/04	>5	>5	>5	4,15	>0,85
719/04	3,4	2,42	2,91	1,5	1,41
102/05	<1	<1	<1	nd	ind
113/05	3,41	3,37	3,39	3,29	0,10
771/04	3,39	2,81	3,10	2,59	0,51
144/05	2,45	2,32	2,39	1,5	0,88
103/05	4,18	4,19	4,18	3,9	0,28
187/05	4,66	4,85	4,75	4,43	0,32
286/05	2,84	3,48	3,16	3,59	- 0,43
280/05	3,27	3,24	3,25	2,8	0,45
285/05	3	3,46	3,23	3,42	- 0,19
364/05	4,26	4,5	4,38	4,25	0,13
378/05	3,3	2,73	3,01	2,67	0,34
349/05	<3	<3	<3	<3	ind
382/05	3,35	3,5	3,42	3,41	0,01
333/05	2,88	2,87	2,87	2,5	0,37
399/05	4,23	4,18	4,20	4	0,20

<sup>a</sup> - Valores expressos em log<sub>10</sub>dil<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> - Média entre os valores de DP<sub>50</sub> dos Grupos I e II.

<sup>c</sup> - Diferença entre os respectivos logaritmos.

ind = indeterminado.

Não foi observada diferença entre os resultados de  $DP_{50}$  nos grupos I e II que justificasse a análise destes dados em separado. Portanto, para a comparação com os demais sistemas, foi considerada a média entre estes dois valores.

#### **4.2.3. Avaliação do isolamento em células BHK-21 e camundongos lactentes e desmamados, e suas respectivas $DICT_{50}$ , $DP_{50}$ e $DL_{50}$**

Em uma amostra (Registro 102/05), o isolamento do vírus foi possível apenas em camundongos lactentes, porém insuficiente para o cálculo da  $DP_{50}$  (**Tabela 3**).

Uma amostra (Reg. 144/05) foi negativa nas três leituras feitas em células (48, 72 e 96 horas), mas positiva em camundongos lactentes e desmamados (**Tabela 3**).

Camundongos lactentes (média da  $DP_{50}$  dos Grupos I e II) apresentaram títulos mais altos do que o cultivo celular (96 horas PI) em 13 (81,25%) das 16 amostras onde foram possíveis os cálculos do *endpoint* 50%. (**Tabela 3**).

Comparado a camundongos desmamados, o cultivo celular obteve menor título em 11 das 16 amostras (68,75%) (**Tabela 3**).

**Tabela 3: Relação das 18 amostras positivas, com seus respectivos valores de DICT<sub>50</sub>, DP<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub>.**

REGISTRO	TÍTULO (log <sub>10</sub> dil <sup>-1</sup> )				
	Células BHK-21 (DICT <sub>50</sub> )			Camundongos	
	48 h	72 h	96 h	Lactentes <sup>a</sup> (DP <sub>50</sub> )	Desmamados (DL <sub>50</sub> )
800/04	nr	3,31	3,16	4,42	3,72
808/04	2,86	3,36	3,51	>5	4,15
719/04	<1	1,85	2,46	2,91	1,5
102/05	nd	nd	nd	<1	nd
113/05	3	3,55	3,54	3,39	3,29
771/04	2,33	3,36	3,21	3,10	2,59
144/05	nd	nd	nd	2,39	1,5
103/05	3,75	4,07	3,75	4,18	3,9
187/05	2,87	3,94	4,5	4,75	4,43
286/05	2,33	2,74	2,62	3,16	3,59
280/05	nd	<1	<1	3,25	2,8
285/05	<1	2	2,51	3,23	3,42
364/05	3,73	3,95	4,2	4,38	4,25
378/05	<1	3,94	2,56	3,01	2,67
349/05	nd	<3	<3	<3	<3
382/05	2,5	2,93	3,29	3,42	3,41
333/05	1,89	2,53	2,47	2,87	2,5
399/05	4,71	>5	>5	4,20	4

<sup>a</sup> – Média dos valores das DP<sub>50</sub> dos grupos I e II.

nr= Teste não realizado.

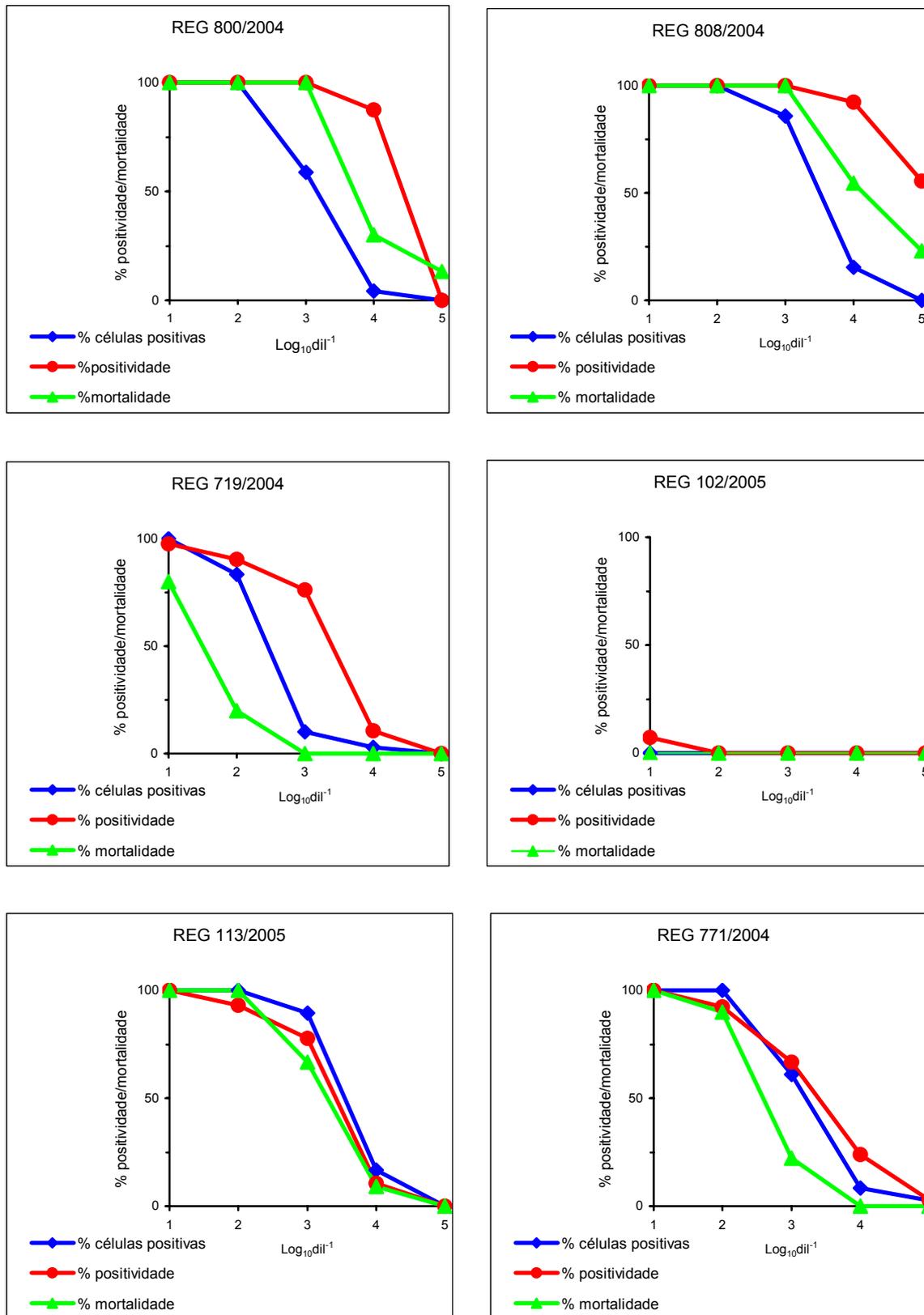
nd = Vírus não detectado.

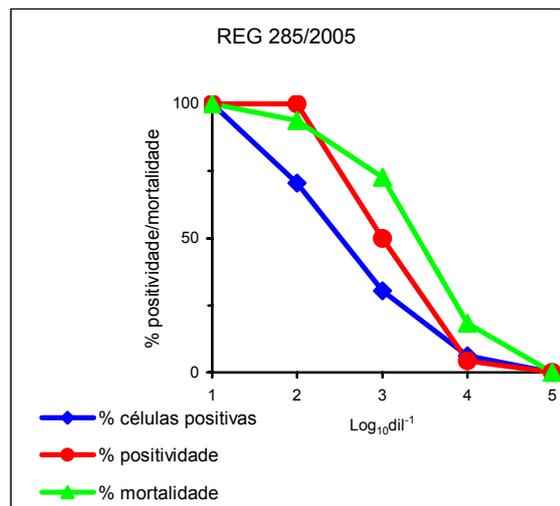
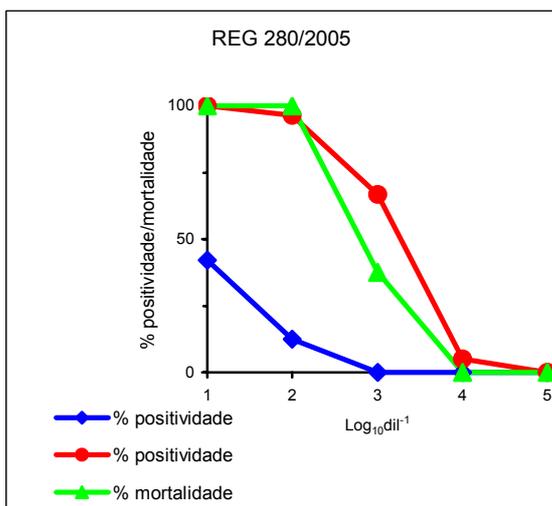
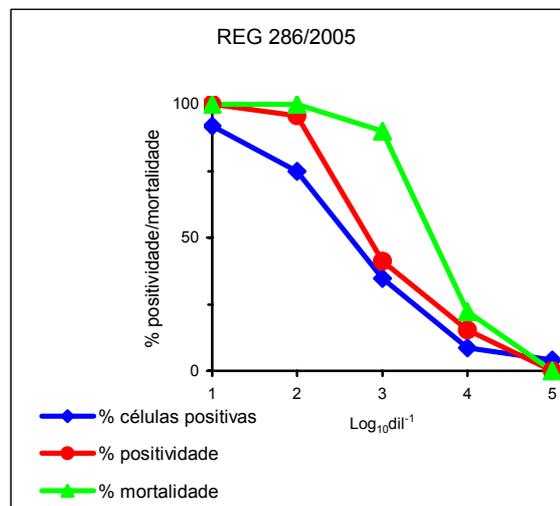
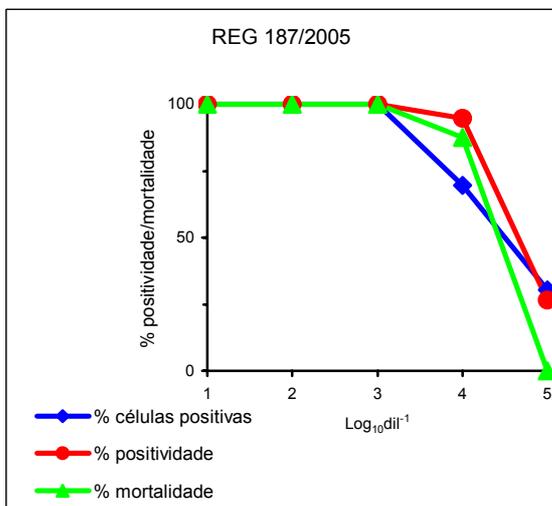
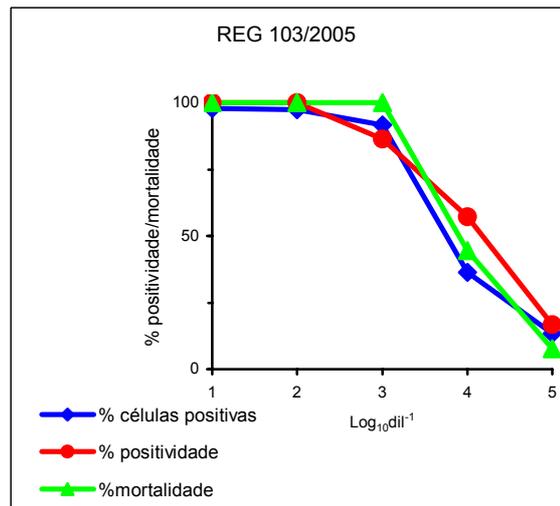
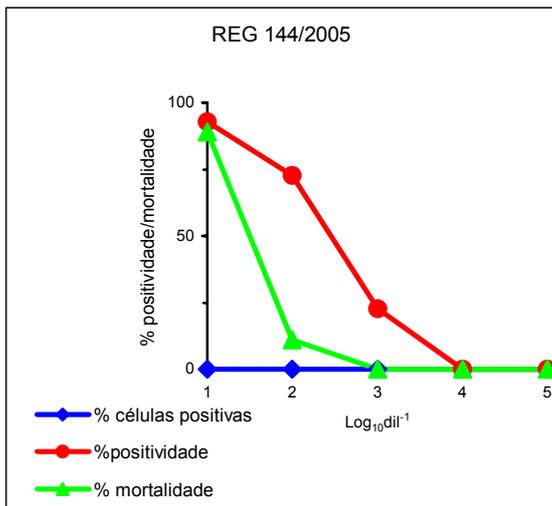
dil. = diluição.

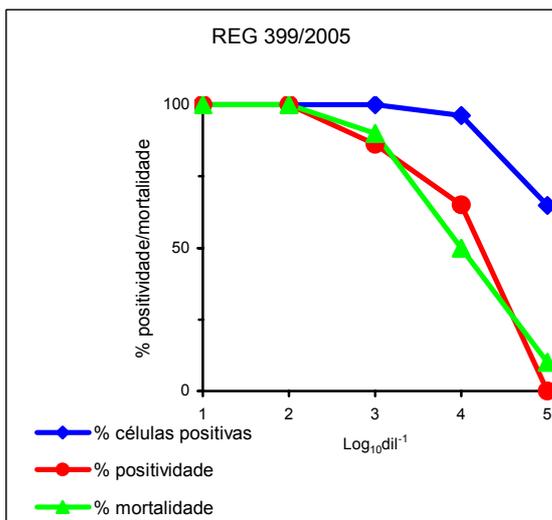
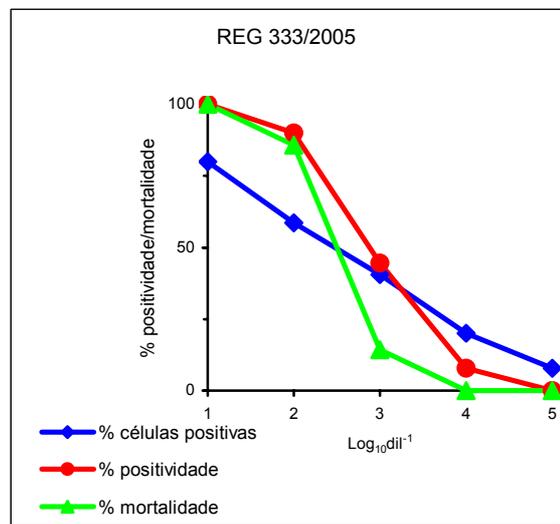
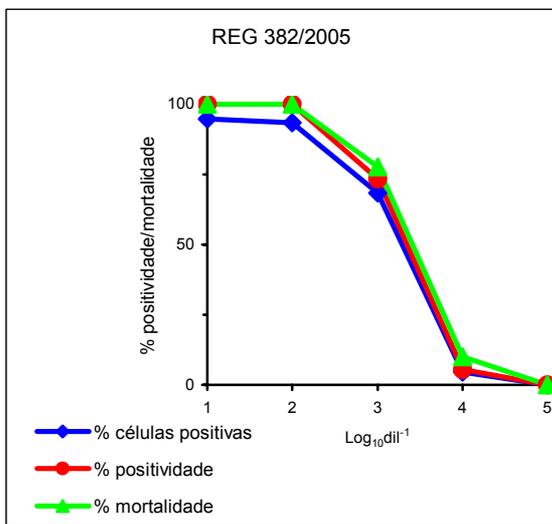
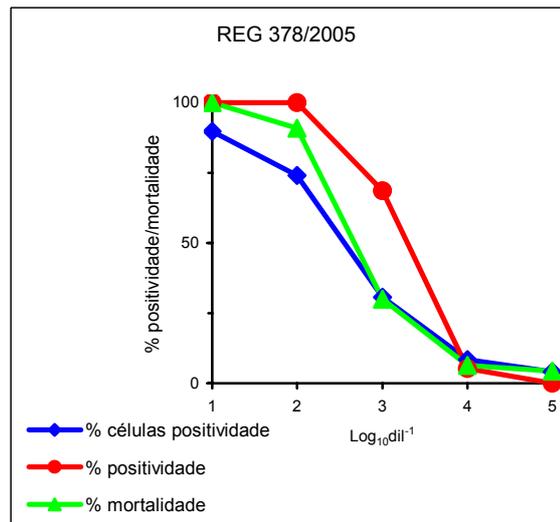
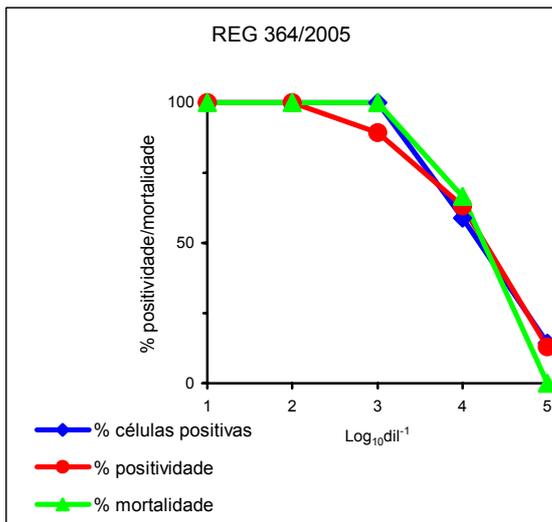
h. = horas

Na **Figura 4**, estão demonstrados os percentuais de positividade calculados, por diluição, para camundongos lactentes (sacrificados no sétimo dia PI) e células BHK-21 (96 horas PI), e mortalidade para camundongos desmamados, em cada amostra. Estes cálculos não foram possíveis para amostra 349/05.

**Figura 4: Percentual acumulado de Positividade no Grupo I, positividade em células BHK-21, 96 horas pós-inoculação, e mortalidade no Grupo III, para 17 amostras inoculadas com as diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ .**

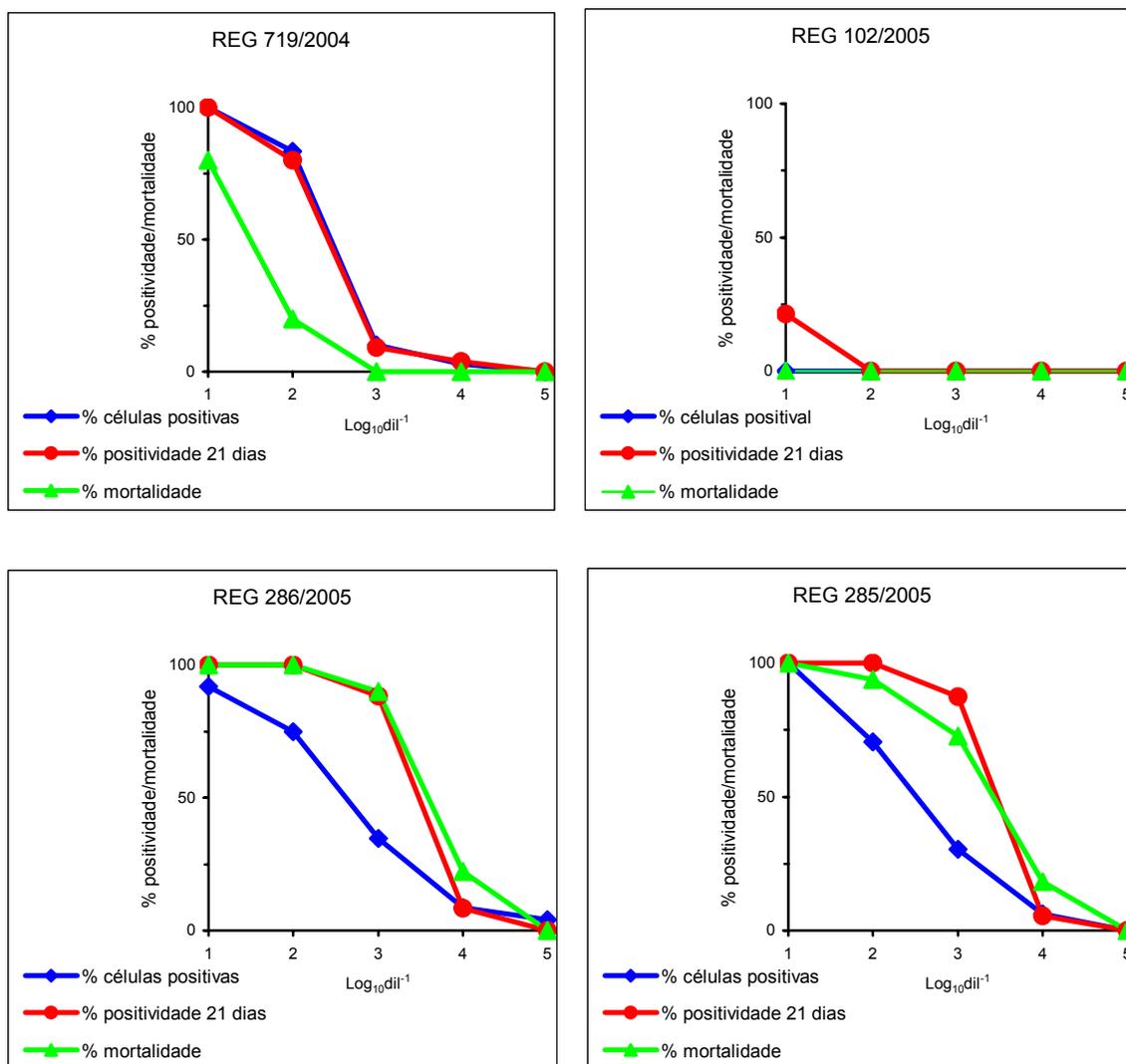






Cabe citar 4 amostras cujos resultados dos Grupo I e II apresentaram valores um pouco mais desiguais, alterando o percentual acumulado de positividade, em uma ou mais diluições, mas na maior parte das vezes apenas na diluição  $10^{-3}$  (Figura 5).

**Figura 5: Percentual acumulado de Positividade no Grupo II, positividade em células BHK-21, 96 horas pós-inoculação, e mortalidade no Grupo III, para 4 amostras inoculadas com as diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ .**

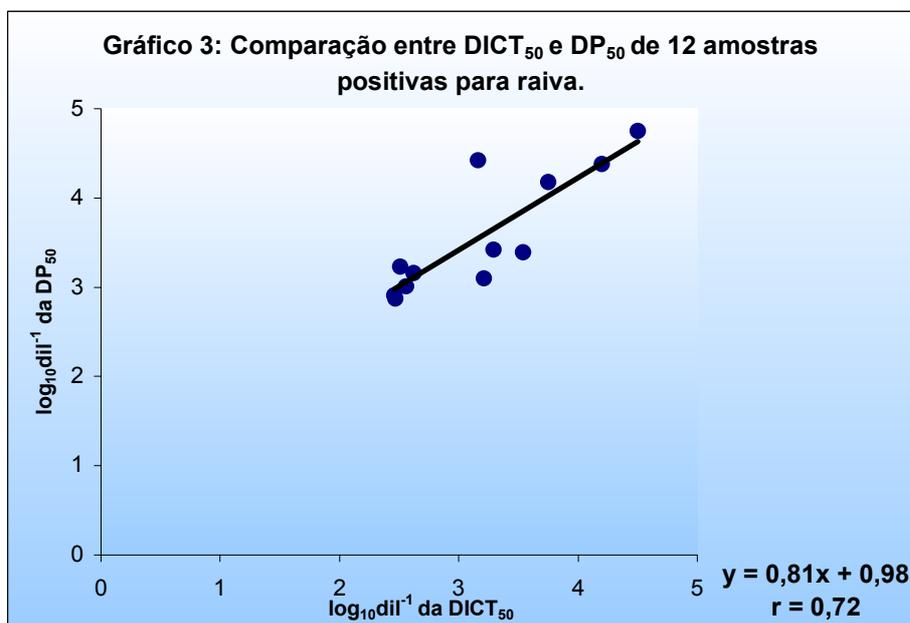


#### 4.2.4. Correlação entre DP<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub> e DICT<sub>50</sub>

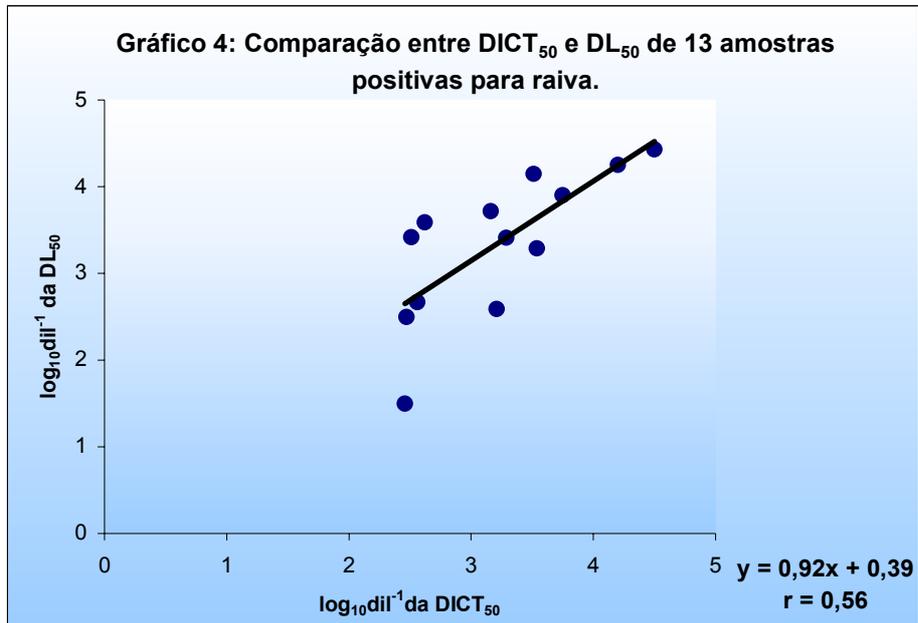
Para a análise da correspondência entre os valores de DP<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub> e DICT<sub>50</sub> de cada amostra positiva, foi calculado o coeficiente de correlação, através da regressão linear simples. Amostras cujo valor de DP<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub> ou DICT<sub>50</sub> não pôde ser calculado ou foi indicado como <1, <3 ou >5, não foram utilizadas nestes gráficos.

Para os cálculos, foram utilizados os valores das médias das DP<sub>50</sub> dos Grupos I e II.

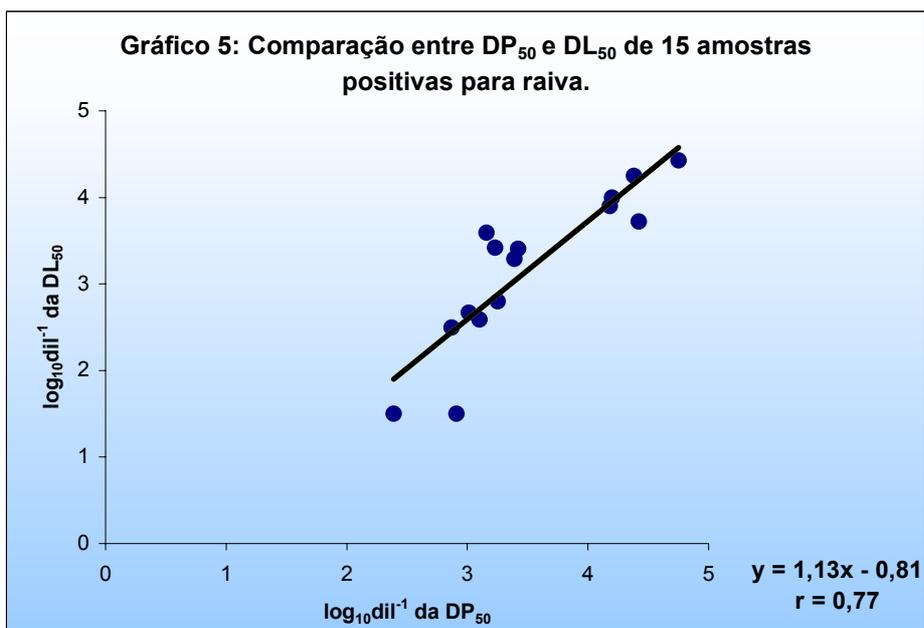
O **Gráfico 3** compara os valores de DICT<sub>50</sub> e DP<sub>50</sub>. Esta análise foi possível para 12 amostras. A equação da reta calculada foi  $[y=0,81x + 0,98]$  e o coeficiente de correlação de 0,72.



O **Gráfico 4** mostra a comparação entre os valores de  $DICT_{50}$  e  $DL_{50}$ . Esta análise foi possível para 13 amostras. A equação da reta calculada foi  $[y=0,92x + 0,39]$  e o coeficiente de correlação de 0,56.



No **Gráfico 5**, observamos a comparação entre  $DP_{50}$  e  $DL_{50}$ . Esta análise foi possível para 15 amostras. A equação da reta calculada foi  $[y= 1,13x + 0,81]$  e o coeficiente de correlação de 0,77.



#### 4.3. AMOSTRAS DE CAMPO NEGATIVAS

A **Tabela 4** apresenta os resultados das dez amostras negativa para raiva, inoculadas em cultura de células BHK-21 e camundongos lactentes. Todas as amostras se confirmaram negativas. Desta forma, a especificidade dos sistemas de cultivo de células BHK-21 e de IC em camundongos lactentes, no diagnóstico da raiva, foi de 100% para as amostras testadas.

**Tabela 4: Relação de dez amostras negativas para raiva, inoculadas em células BHK-21 e camundongos lactentes.**

REG	ESPÉCIE	Inoculação em células BHK-21	Inoculação em camundongos lactentes
432/04	Ovino	NEG	NEG
313/05	Equino	NEG	NEG
355/05	Bovino	NEG	NEG
389/05	Felino	NEG	NEG
397/05	Canino	NEG	NEG
527/05	Canino	NEG	NEG
528/05	Canino	NEG	NEG
531/05	Canino	NEG	NEG
532/05	Canino	NEG	NEG
533/05	Felino	NEG	NEG

NEG = negativo

## 5. DISCUSSÃO

Foram consideradas Positivas, neste experimento, aquelas amostras cujo isolamento do vírus rábico foi confirmado em pelo menos um dos sistemas propostos.

A concentração de células BHK-21 (C13) utilizada para semear as microplacas de 96 poços foi um fator relevante, uma vez que foram feitas três leituras, em períodos diferentes de tempo. Logo, uma concentração muito baixa resultaria em tapete muito aberto na primeira leitura (em 48 horas PI), enquanto que uma concentração muito alta resultaria em perda da qualidade da monocamada após 96 horas. RUDD, TRIMARCH & ABELSETH (1980), utilizaram suspensões de células BHK-21 na concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL e RUDD & TRIMARCH (1987) utilizaram a concentração de  $6 \times 10^5$  células/mL. Porém, em nosso trabalho, monocamadas de boa qualidade em todas as etapas de avaliação foram observadas semeando em torno de  $2,8 \times 10^5$  células/mL de meio.

A utilização de G-MEM foi adequada ao cultivo das células BHK-21, que mantiveram crescimento e morfologia satisfatórios.

O acondicionamento das placas em estufa com filmes adesivos constituiu um modo eficiente para manutenção das placas, na ausência de estufa de CO<sub>2</sub>. Houve crescimento regular do tapete celular em todas as placas, com alguma perda nos poços inoculados com a diluição  $10^{-1}$ . Nos demais poços, as perdas foram insignificantes. BUTLER (1992a), relata que o CO<sub>2</sub> necessário ao crescimento das células pode ser fornecido por uma atmosfera controlada em um incubador ou CO<sub>2</sub> suficiente pode ser gerado pela própria cultura, em pequenas garrafas vedadas.

Em nosso experimento, o número de passagens das células utilizadas para a inoculação das placas foi limitado a, no máximo, dez passagens, a partir do momento do descongelamento das células no laboratório, sendo possível a obtenção de monocamadas de boa qualidade. A manutenção das células em garrafas em sucessivas passagens (não utilizadas no experimento) nos permitiu verificar perda da qualidade da monocamada e da morfologia das células por volta da décima quinta passagem. RUDD & TRIMARCHI (1989) encontraram redução na susceptibilidade de células neuroblastoma (NA-C1300) após alto número de passagens (acima de 50 passagens).

RUDD & TRIMARCHI (1987) compararam a sensibilidade de células neuroblastoma murino (NA-C1300) e BHK-21 (C13), no isolamento de pequenas quantidades de vírus rábico de rua. Compararam ainda o resultado do isolamento *in vitro* com a IFD e IC de camundongos desmamados, e encontraram resultados bastante semelhantes entre IFD, IC e isolamento em neuroblastoma, porém células BHK-21 foram muito inferiores, com apenas três amostras positivas em 20. É necessário, porém, destacar que as células BHK-21 foram utilizadas, por estes autores, com 70 a 95 passagens, número muito mais alto que as neuroblastoma, utilizadas com 30 a 50 passagens. Outra observação deve ser feita sobre a concentração das amostras inoculadas, 1:5 e 1:10. Os próprios autores destacam que suspensões a 10% podem ser inibitórias para células BHK-21, por terem alta concentração de fatores de inibição. Além disso, no teste de IC, foram utilizados camundongos desmamados, comprovadamente menos sensíveis ao vírus rábico do que os lactentes (KOPROWSKI, 1996; SILVA, 2000).

Para as amostras avaliadas em nosso trabalho, encontramos valores de sensibilidade iguais a 100% para camundongos lactentes, 94,44% para camundongos desmamados e 88,89% para células BHK-21. RUDD & TRIMARCHI (1989) encontraram valores de sensibilidade iguais a 93%, 88% e 95% para as técnicas de IFD, IC de camundongos desmamados e TICT com células neuroblastomas (NA-C1300), respectivamente, utilizando amostras fracamente positivas. SMITH et al (1978) encontraram sensibilidade equivalente a 93,75% para cultivo de células CER e neuroblastoma (clone N18) inoculadas com vírus rábico de rua e submetidas à IFD, e, segundo BORDIGNON et al (2001), células C6 mostraram ser 100% equivalentes à IFD e à IC de camundongos desmamados, em todas as amostras avaliadas.

Na presente pesquisa, optamos por inocular células em suspensão, tripsinizadas no momento da inoculação, de acordo com o WEBSTER & CASEY (1996). A inoculação das células recém-tripsinizadas não mostrou nenhum tipo de inconveniente, e o consideramos uma forma relativamente prática de ter acesso à quantidade desejada de células. No entanto, RUDD, TRIMARCHI & ABELSETH (1980) destacam que a estocagem de células BHK-21 a 4 °C por até sete dias oferece fácil acesso às células para isolamento e titulação de rotina. KING (1996), relata que boa produção de vírus pode ser obtida quando células em suspensão são infectadas e então deixadas em repouso para formarem tapete. RUDD & TRIMARCHI (1989) e CARVALHO (2001), não observaram diferenças na

susceptibilidade das células neuroblastoma ao compararem a infecção de monocamada já confluyente e de células em suspensão.

Alguns autores sugerem que o TICT pode ser prejudicado pela inoculação de diluições muito concentradas, o que pôde ser constatado em nossas amostras, onde os poços inoculados com as diluições de vírus a 10% resultavam em monocamadas nitidamente de qualidade inferior ou em ausência de crescimento celular. CLARK (1980), observou o fenômeno da autointerferência devida à inoculação de materiais muito concentrados para o isolamento de vírus rábico em células neuroblastoma (NA-C1300). Da mesma forma, SMITH et al (1977), relata que a falta de linearidade na porcentagem de células infectadas em diferentes diluições de alguns inóculos pode refletir autointerferência. Segundo os autores, na técnica clássica de inoculação em camundongos e em cultura de células, a autointerferência é freqüentemente vista nas diluições mais concentradas das titulações e possivelmente reflete diferentes proporções de partículas padrão e defectivas no inóculo.

RUDD & TRIMARCHI (1989) sugerem que a alta concentração de fragmentos parece bloquear a adesão das células à superfície de crescimento e, testando o efeito da centrifugação da suspensão de vírus a 10%, estabeleceu que 200 x g oferecia clarificação suficiente para permitir a adesão satisfatória das células à superfície de crescimento. Esta velocidade foi utilizada em nosso trabalho, pelo tempo de quinze minutos, mas não evitou que algumas amostras, na diluição  $10^{-1}$ , tivessem redução na adesão das células à placa. Na maioria de nossas amostras, a diluição  $10^{-2}$  permitiu melhor crescimento celular e maior taxa de infecção viral. Este fato está em acordo com o relato de CARVALHO (2001) e RUDD, TRIMARCHI & ABELSETH (1980), que encontraram melhores resultados utilizando diluições a 1% e aconselham a utilização, na rotina, de suspensões a 10% e 1% para o diagnóstico *in vitro* da raiva. SMITH et al (1978), observaram em seu experimento que uma das amostras foi positiva na diluição 1% e negativa na diluição 10%, e aventam a possibilidade de isso ser devido à diluição de algum fator de inibição na suspensão.

Da mesma forma, WEBSTER (1987) concluiu ser a diluição  $10^{-2}$  a melhor para o isolamento do vírus rábico de rua em células NA, onde problemas associados à citólise devida à contaminação bacteriana ou agentes tóxicos foram eliminados na maioria dos casos. Em nosso experimento, as duas amostras que resultaram negativas ao TICT e positivas à IC de camundongos, apresentavam

alta contaminação, comprovada macroscopicamente nos 16 poços inoculados com as diluições  $10^{-1}$ , nas três placas dos dois materiais.

Outros autores relacionam a sensibilidade do diagnóstico em cultura de células a fatores inerentes à amostra de vírus em questão. CHITRA, PANDIT & KALYANARAMAN (1988), avaliando amostras de diferentes espécies animais positivas para raiva, encontraram amostras provenientes de bovinos, que apresentaram maior dificuldade em se adaptar e crescer em cultivo de células neuroblastoma (N2A) em primeira passagem. WEBSTER (1987), relata que nem todas as cepas de vírus rábico replicam igualmente bem em células BHK-21. WEBSTER, CHARLTON & CASEY (1988) verificaram que diferenças nos vírus rábicos de rua podem afetar os resultados dos procedimentos diagnósticos, e sugerem que a eficiência no isolamento pode também depender da amostra de vírus e não somente do tipo de célula utilizada. Em nosso trabalho, não observamos relação direta entre espécie animal e redução de sensibilidade do cultivo celular, mas não é possível descartar a hipótese de que particularidades das amostras virais possam ter interferido, principalmente nas duas amostras isoladas em camundongos e negativas em cultura de células.

A origem das células (nervosa ou não) é outra variante envolvida na sensibilidade do TICT. Para UMOH & BLENDER (1983), que testaram o isolamento de amostras de vírus rábico em células de cérebro e de rim de cangambá, o tipo de célula, se nervosa ou renal, foi um fator mais importante do que a adaptação do vírus à determinada espécie. RUDD & TRIMARCHI (1987) compararam o isolamento do vírus da raiva em células neuroblastoma (NA-C1300) e BHK-21 (C13), encontrando maior sensibilidade nas células de origem nervosa. Os autores sugerem a hipótese de células neuroblastoma possuírem receptores de superfície similares aos presentes nas células do cérebro de camundongo.

RUDD, TRIMARCHI & ABELSETH (1980), avaliaram o cultivo de células BHK-21 no isolamento primário do vírus rábico de rua, titulando paralelamente em camundongos desmamados. Em 40% das amostras, o TICT apresentou maior *endpoint* que a IC em camundongos e em 45% as duas técnicas apresentaram *endpoints* iguais. Em nosso experimento, optamos por avaliar o *endpoint* 50%, por ser uma medida mais exata. Observamos, então, que a  $DICT_{50}$  foi mais elevada em apenas 18,75% das amostras, quando comparada à  $DP_{50}$ , e que, quando comparada à  $DL_{50}$ , a  $DICT_{50}$  foi maior em 31,25% das

amostras. Na comparação com camundongos lactentes e desmamados, foram utilizados os valores de  $DICT_{50}$  obtidos em 96 horas, por ser considerado o padrão para o diagnóstico da raiva em cultivo celular (WEBSTER & CASEY, 1996). Em contraste, LARGUI et al (1975), comparando o isolamento do vírus rábico em células BHK-21 e em camundongos lactentes, encontraram um número duas vezes e meia maior de amostras positivas em células do que em camundongos. Porém, é necessário destacar que, no referido experimento, os autores utilizaram a dose de 0,01 mL para a IC dos camundongos lactentes, ou seja, metade da dose indicada, que é de 0,02 mL (SUREAU, RAVISSE & ROLLIN, 1991), o que pode ter sido a causa desta discrepância. CARVALHO (2001), em experimento realizado com células neuroblastoma (N2A) e camundongos desmamados, encontrou  $DICT_{50}$  maior que a  $DL_{50}$  em todas as amostras analisadas.

O presente trabalho não comparou a  $DICT_{50}$  na presença de DEAE-D com a  $DICT_{50}$  na ausência deste polímero. Contudo, optamos por sua utilização, baseados nos relatos de RUDD & TRIMARCHI (1989) e CARVALHO (2001) que, apesar de não terem observado alteração no *endpoint* de células com e sem DEAE-D, verificaram aumento da taxa de infecção na sua presença. Em nossa pesquisa, utilizamos o DEAE-D na concentração final de 50  $\mu\text{g/mL}$ , com troca do meio após 1 hora de incubação, conforme sugerido por RUDD, TRIMARCHI & ABELSETH (1980), uma vez que, após este período, o dextrano, nesta concentração, é tóxico para células BHK-21. Este procedimento torna a técnica um pouco menos prática, uma vez que se faz necessário acrescentar mais uma etapa, porém se justifica pela possibilidade de aumentar a sensibilidade do TICT. Além disso, acreditamos que a troca do meio contendo DEAE-D por meio fresco não reduziria a chance de outras partículas virais serem adsorvidas às células, visto que IWASAKI, WIKTOR & KOPROWSKI (1973), comprovaram que 1 hora após a infecção, não existe mais evidência de entrada de vírus nas células.

A aplicação da regressão linear simples entre os valores obtidos para cada amostra em cultura de células BHK-21 e em camundongos lactentes mostra que o cultivo celular não apresentou boa correlação com camundongos lactentes (**Gráfico 3**). O coeficiente de correlação da comparação de células BHK-21 e camundongos desmamados também não foi satisfatório (**Gráfico 4**). Na avaliação de camundongos lactentes e desmamados foi obtido o melhor

coeficiente de correlação ( $r=0,77$ ) (**Gráfico 5**). SILVA (2000) encontrou ótimo coeficiente de correlação (igual a 0,97) na comparação da inoculação intracerebral de camundongos lactentes e desmamados, no isolamento do vírus rábico de rua.

CARVALHO (2001) comparando a inoculação em cultivo de células neuroblastoma (N2A) e camundongos desmamados, encontrou uma amostra positiva ao TICT que haviam sido negativas à IFD e à IC em camundongos. Entretanto, duas outras amostras positivas à IFD e IC em camundongos, e uma positiva apenas à IFD, foram negativas ao TICT. Desta forma, o autor conclui que o sistema de isolamento em cultivo de células N2A pode ser introduzido na rotina dos laboratórios de diagnóstico de raiva, mas sugere que, a princípio, seja feita uma avaliação em paralelo com a IC em camundongos, até que o TICT se confirme uma técnica segura.

Uma das maiores vantagens da utilização do cultivo celular no diagnóstico da raiva é a redução considerável no período de conclusão da prova de isolamento do vírus que, hoje, é de 21 dias para camundongos desmamados, segundo KOPROWSKI (1996). Em nosso experimento, resultados positivos já foram encontrados 48 horas PI, porém, em amostras com menor concentração de vírus, um período de incubação de 96 horas foi mais seguro, apesar de após 72 horas já ter sido possível isolar vírus de todas as amostras que foram positivas ao TICT (**Gráfico 2**). Estes resultados estão em conformidade com os relatos de RUDD & TRIMARCHI (1989), que encontraram maiores títulos no quarto dia pós-infecção. CARVALHO (2001), estabeleceu o período de 96 horas pós-inoculação como o melhor para o isolamento do vírus rábico em cultivo de células N2A, e relatou queda do título viral após 120 horas de incubação.

Em nosso trabalho, foi possível estabelecer que as células BHK-21 (C13) possuem boa sensibilidade, próxima a 90%, e ótima especificidade (100%), mas camundongos lactentes foram mais adequados ao isolamento do vírus rábico de rua em baixas concentrações, com 100% de sensibilidade e especificidade, nas amostras testadas. Dentre os métodos de isolamento de vírus rábico avaliados, a utilização de camundongos lactentes, sacrificados no sétimo dia PI e submetidos à IFD, foi o que ofereceu melhor resultado. Esta afirmação está em acordo com o relato de SILVA (2000), que estabeleceu o período de sete dias para obtenção de positividade em 100% dos casos de raiva, quando são

utilizados camundongos lactentes na prova de inoculação intracerebral, mesmo em amostras contendo baixa concentração de vírus.

A amostra de registro 102/05 que, em nosso experimento, foi positiva apenas em camundongos lactentes, também havia sido negativa ao teste de IFD. É neste tipo de material, onde encontramos concentração de vírus extremamente baixa, que reside o perigo da inoculação apenas de camundongos desmamados, uma vez que seria diagnosticado falso-negativo, o que seria um grave problema em caso de vítimas de agressão deste animal. SILVA (2000) igualmente afirma a ocorrência, em seu experimento, de uma amostra positiva na inoculação de camundongos lactentes e negativa em camundongos desmamados.

CHITRA, PANDIT & KALYANARAMAN (1988) citam entre as desvantagens do uso de camundongos, a necessidade de manutenção de um bom biotério e o longo tempo necessário ao diagnóstico. A redução do período de observação para sete dias, com a utilização de camundongos lactentes, elimina uma destas desvantagens. BOURHY et al (1989) concordam que a utilização de camundongos recém-natos, ao invés de desmamados, pode encurtar a observação para 5 a 7 dias.

A utilização de camundongos lactentes na rotina do diagnóstico de raiva, sacrificados no sétimo dia PI e submetidos à IFD, oferece auxílio para os casos onde está indicado o tratamento profilático completo de 5 doses de vacina de cultivo celular. Um laudo laboratorial conclusivo em 7 dias, reduziria este esquema vacinal em 2 ou até 3 doses, o que é especialmente importante sob o ponto de vista do paciente, pois é capaz de minimizar o trauma físico e psicológico a que as pessoas envolvidas em acidentes com suspeita de exposição ao vírus rábico ficam sujeitas.

A natureza decisiva do diagnóstico da raiva impõe que as técnicas laboratoriais utilizadas sejam padronizadas, rápidas, sensíveis, específicas e seguras (VELLECA & FORRESTER, 1981). Embora a substituição do uso de animais de laboratório por técnicas *in vitro* seja uma tendência mundial, no caso do método de inoculação em células BHK-21 (C13) para o diagnóstico da raiva, ainda são necessárias pesquisas aprofundadas a respeito de sua segurança. A aplicação deste método diagnóstico nas amostras avaliadas neste estudo, nos sugere que devem ser estudados parâmetros capazes de elevar sua sensibilidade.

A procura por métodos diagnósticos que ofereçam resultados rápidos é de extrema valia ao tratarmos de uma das doenças que causam maior impacto psicológico às pessoas envolvidas em uma suposta exposição ao vírus, e para a qual não existe tratamento que evite a morte do paciente, uma vez manifestados sintomas. Pelo mesmo motivo, porém, não se pode optar pela utilização de técnicas que comprometam a segurança e a sensibilidade do diagnóstico.

## 6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos nos permite concluir que:

- A técnica de inoculação intracerebral em camundongos lactentes mostrou-se mais adequada ao isolamento do vírus rábico de rua, em comparação à utilização de camundongos desmamados e cultivo de células BHK-21 (C13).

- Camundongos lactentes apresentaram 100% de sensibilidade e especificidade no isolamento do vírus rábico de rua, mesmo em amostras com baixa concentração viral.

- A utilização da técnica de inoculação intracerebral de camundongos lactentes, sacrificados no sétimo dia pós-inoculação e submetidos ao teste de imunofluorescência direta, possibilita a conclusão do diagnóstico em tempo hábil de permitir a alteração do tratamento profilático anti-rábico pós-exposição humano, bem como auxiliar a vigilância epidemiológica da raiva.

## 7. REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ALBAS, A. et al. Influence of canine brain decomposition on laboratory diagnosis of rabies. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 19-22, 1999.

ATANASIU, P.; GAMET, A.; GUILLON, J. C. Limites du diagnostic de la rage au laboratoire. **Recueil de Médecine Vétéaire**, v. 11, p.1083-1088, 1968.

BAER, G. M.; LENTZ, T. L. Rabies pathogenesis to the central nervous system. In: BAER, G. M., ed. **The Natural History of Rabies**, 2<sup>nd</sup> ed., Florida: CRC Press, 1991. p. 105-120.

BAILEY, C. A.; MILLER, D. K.; LENARD, J. Effects of DEAE-Dextran on infection and hemolysis by VSV. Evidence that nonspecific electrostatic interections mediate effective binding of VSV to cells. **Virology**, v. 133, p.111-118, 1984.

BBC NEWS. **Two die in German rabies outbreak**. Disponível em: <<http://news.bbc.co.uk/2/hi/europe/4284857.stm>>. Acesso em 17 jul. 2005.

BORDIGNON, J. et al. Isolation and replication of rabies virus in C6 Rat Glioma cells (clone CCL-107). **Biologicals**, v. 29, p. 67-73, 2001.

BOURHY, H. et al. Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. **Journal of Clinical Microbiololy**, v. 27, n. 3, p. 519-523, Mar. 1989.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 347, de 02 de dezembro de 2003. Determina Normas Técnicas para o Funcionamento de Bancos de Olhos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, de 03 dez. 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 05 jul. 2005.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. vol.II. 5 ed. Brasília: FUNASA, 2002. 842 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1.984, de 25 de outubro de 2001a. Aprovar as "Planilhas de Notificação Obrigatória de Doenças entre os Estados Partes do MERCOSUL", em sua versão em português, que consta como Anexo e fazem parte da Resolução GMC nº 50/99. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, de 29 out. 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 05 jul. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1.943, de 18 de outubro de 2001b. Define a relação de doenças de notificação compulsória para todo território nacional. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**,

---

<sup>1</sup> Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, 2002 – NBR 6023.

Brasília, DF, de 24 out. 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 05 jul. 2005.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, de 20 set. 1990.

BROUGHAN, J. H.; WUNNER, W. H. Characterization of protein involvement in rabies virus binding to BHK-21 cells. **Archives of Virology**, v. 140, p. 75-93, 1995.

BUTLER, M. Culture Media. In: BUTLER, M.; DAWSON, M. eds. **Cell Culture Labfax**. Oxford: Academic Press, 1992a. p. 85-106.

BUTLER, M. Supplements to basal media. In: BUTLER, M.; DAWSON, M. eds. **Cell Culture Labfax**. Oxford: Academic Press, 1992b. p. 107-133.

CARVALHO, A. A. B. Sistema alternativo para o diagnóstico da raiva utilizando células de neuroblastoma murino: teste com amostras isoladas no Brasil. São Paulo, SP: USP, 2001. Originalmente apresentada como tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2001.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Rabies, Diagnosis**. Disponível em: <http://www.cdc.gov>. Acesso em: 21 mar. 2005.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Investigation of rabies infections in organ donor and transplant recipients – Alabama, Arkansas, Oklahoma, and Texas, 2004. **MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 53, n. 26, p. 586-589, jul. 2004a. Disponível em: <http://www.cdc.gov>. Acesso em: 21 mar. 2005.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Update: Investigation of rabies infections in organ donor and transplant recipients – Alabama, Arkansas, Oklahoma, and Texas, 2004. **MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 53, Dispatch; 1, jul. 2004b. Disponível em: <http://www.cdc.gov>. Acesso em: 21 mar. 2005.

CHITRA, L.; PANDIT, V.; KALYANARAMAN, V. R. Use of murine neuroblastoma culture in rapid diagnosis of rabies. **Indian J. Med. Res.**, v. 87, p. 113-116, fev. 1988.

CLARK, H. F. Rabies serogroup viruses in Neuroblastoma cells: propagation, "autointerference", and apparently random back-mutation of attenuated viruses to the virulent state. **Infection and Immunity**, v. 27, n. 3, p. 1012-1022, 1980.

CLARK, H. F. Growth and attenuation of rabies virus in cell cultures of reptilian origin. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 139, p. 1317-1325, 1972.

CREPIN, P. et al. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 1117-1121, 1998.

DANTAS JÚNIOR, J. V. et al; Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rabies virus detection. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 56, n. 3, p. 398-400, 2004.

DAVID, D. et al. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 111-118, 2002.

DAWSON, M. Initiation and maintenance of cultures. In: BUTLER, M.; DAWSON, M. eds. **Cell Culture Labfax**. Oxford: Academic Press, 1992. p. 25-42.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F. -X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H., ed. **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>th</sup> ed. Geneva: World Health Organization, 1996, p. 88-95.

DELPIETRO, H. A.; LARGHI, O. P.; RUSSO, R. G. Virus isolation from saliva and salivary glands of cattle naturally infected with paralytic rabies. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 48, p. 223-228, 2001.

FEKADU, M. Canine rabies. In: BAER, G. M., ed., **The Natural History of Rabies**, 2<sup>nd</sup> ed., Florida: CRC Press, 1991. p. 367-378.

FOOKS, A. R. The challenge of new and emerging lyssaviruses. **Expert Rev. Vaccines**, v. 3, n. 4, p. 333-336, 2004.

FRESHNEY, R. I. Introduction. In: FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells. A manual of basic technique**, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley-Liss, 1987a, p. 1-6.

FRESHNEY, R. I. Quantitation and experimental design. In: FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells. A manual of basic technique**, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley-Liss, 1987b, p. 227-244.

GALLINA, et al. Obtention of rabies antigen through BHK-21 cells adhered to microcarriers. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 40, n. 5, p. 291-294, 1998.

GERMANO, P. M. L. Avanços na pesquisa da raiva. **Rev. Saúde Pública**, v.28, n.1, p. 86-91, 1994.

HUMMELER, K.; KOPROWSKI, H.; WIKTOR, T.J. Structure and development of rabies virus in tissue culture. **Journal of Virology**, v. 1, n.1, p. 152-170, 1967.

IWASAKI, Y.; CLARK, H. F. Cell to cell transmission of virus in the Central Nervous System. II. Experimental rabies in mouse. **Laboratory Investigation**, v. 33, n. 4, p. 391-399, 1975

IWASAKI, Y.; TOBITA, M., Pathology. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**, San Diego: Academic Press, 2002. p. 283-306.

IWASAKI, Y.; WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Early events of rabies virus replication in tissue cultures. An electron microscopic study. **Laboratory Investigation**, v.28, n. 2, p. 142-148. 1973.

JACKSON, A. C. Pathogenesis. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**, San Diego: Academic Press, 2002. p. 245-282.

JACKSON, A. C. Rabies. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, Viral infections, v. 5, p. 35–40, 2003. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com>>. Acesso em: 05 jul. 2005.

JOHNSON, H. N. Rabies Virus. In: HORSFALL, F. L.; TAMM, I., ed., **Viral and rickettsial infections of man**, 4<sup>th</sup> ed., Philadelphia: Lippincott, 1965, p.814-840.

KAPLAN, M. M. Safety precautions in handling rabies virus. In: MESLIN, F. –X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H., ed., **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>th</sup> ed., Geneva: World Health Organization, 1996, p.03-08.

KASEMPIMOLPORN, S. et al. Detection of rabies virus antigen in dog saliva using a latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 3098-3099, 2000.

KING, A. A. Cell culture of rabies virus. In: MESLIN, F. –X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H., ed., **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>th</sup> ed., Geneva: World Health Organization, 1996, p. 114-130.

KING, A. A.; TURNER, G. S. Rabies: a review. **J. Comp. Path.**, v. 108, p. 1-39, 1993.

KISLING, R. E. Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 98, p. 223-225, 1958.

KOPROWSKI, H. The virus - Overview. In: BAER, G. M., ed., **The Natural History of Rabies**, 2<sup>nd</sup> ed., Florida: CRC Press, 1991. p. 27-29.

KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F. –X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H., ed., **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>th</sup> ed., Geneva: World Health Organization, 1996, p. 80-87.

LARGUI, O. P. et al. Sensitivity of BHK-21 cells supplemented with diethylaminoethyl-dextran for detection of street rabies virus in saliva samples. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 1, n. 3, p. 243-245, mar. 1975.

LENETTE, E. H.; EMMONS, R. W. The laboratory diagnosis of rabies: Review and prospective. In: NAGANO, Y.; DAVENPORT, F. M., eds., **Rabies**. Tokyo: University of Tokyo Press, 1971, p.77-94.

LENTZ, T. L. et al. Is the Acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science**, v. 215, p. 182-184, jan. 1982.

LÉPINE, P.; ATANASIU, P. Histopathological diagnosis. In: MESLIN, F. –X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H., ed., **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>th</sup> ed., Geneva: World Health Organization, 1996, p. 66-79.

LYCKE, E.; TSIANG, H. Rabies Virus Infection of Cultured Rat Sensory Neurons. **Journal of Virology**, p.2733-2741, sept. 1987.

MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Virology Fields**, 4<sup>th</sup> ed. Florida: William and Wilkins, 2001, p. 1245-1268.

MEDIA RELEASE. Eye Bank Association of America. **The Eye Bank Association of America Statement regarding transmission of rabies via organ transplantation**. Jul. 2004. Disponível em: <http://www.restoresight.org>. Acesso em: 28 jul. 2005.

MESLIN, F. -X.; KAPLAN, M. M. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: MESLIN, F. -X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H., ed., **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>th</sup> ed., Geneva: World Health Organization, 1996, p. 09-27, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Raiva humana transmitida por morcegos no Estado do Maranhão**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 29 jul. 2005a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Raiva humana transmitida por morcegos no Estado do Pará e Maranhão**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 29 jul. 2005b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Tópicos em Saúde – Raiva**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 05 jul. 2005c.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Notas Técnicas. **Raiva Humana Transmitida por morcegos no estado do Pará**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 18 nov. 2004.

NATHANSON, N.; GONZALES-SCARANO, F. Immune response to Rabies Virus. In: BAER, G. M., ed., **The Natural History of Rabies**, 2<sup>nd</sup> ed., Florida: CRC Press, 1991, p. 145-161.

NOGUEIRA, Y. L. Estimativa de validade de um novo método de isolamento de vírus rábico. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, n. 2, p. 315-322, 2004.

NOGUEIRA, Y. L. Morphometric analysis of McCoy cells inoculated with cerebrospinal fluid from patients with rabies. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 4, p. 509-514, jul./aug. 1998.

OIE. World Organization for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Rabies. Disponível em: <[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00044.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00044.htm)>. Acesso em: 17 mar. 2005.

PEARCE, J. M. S. Louis Pasteur and Rabies: a brief note. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 73, p.82, 2002.

PÉREZ, O.; PAOLAZZI, C. C. Production methods for rabies vaccine. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 340-347, 1997.

RAY, N. B. et al. Rabies viruses infect primary cultures of murine, feline, and human microglia and astrocytes. **Archives of Virology**, n. 142, p. 1011-1019, 1997.

RAY, N. B.; EWALT, L. C.; LODMELL, D. L. Rabies virus replication in primary murine bone marrow macrophages and in human and murine macrophage-like cell lines: implications for viral persistence. **Journal of Virology**, v. 69, n. 2, p. 764-772, 1995.

REED, L. J.; MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg.**, v. 27, p. 495-497, 1938.

RIZZO, E.; TUCHIYA, H. N.; MARTINEZ, C. H. **Técnicas básicas de cultivo celular**. Instituto Butantan; Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 1983, 133 p.

RUDD, R. J.; TRIMARCHI, C. V. 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**, v. 27, n. 11, p. 2522-2528, nov. 1989.

RUDD, R. J.; TRIMARCHI, C. V. Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 1456-1458, aug. 1987.

RUDD, J. R.; TRIMARCHI, C. V.; ABELSETH, M. K. Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 12, n.4, p. 590-593, oct. 1980.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **THE LANCET Infectious Diseases**, v. 2, p. 327-343, jun. 2002.

SES/DF. Secretaria de Estado e Saúde. Governo do Distrito Federal. **Nota Técnica: Raiva**. Jul. 2005. Disponível em: <<http://www.saude.df.gov.br>>. Acesso em: 17 jul. 2005.

SEGANTI, L. et al. Susceptibility of mammalian, avian, fish, and mosquito cell lines to rabies virus infection. **Acta Virol**, v. 34, p. 155-163, 1990.

SILVA, M. V. O uso de camundongos lactentes e a redução no período de duração da prova de inoculação no diagnóstico laboratorial da raiva. Rio de Janeiro, RJ: UFRJ, 2000. Originalmente apresentada como dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

SMITH, A. L. et al. Isolation of field rabies virus strains in CER and Murine Neuroblastoma cell cultures. **Intervirology**, v. 9, p. 359-361, 1978.

SMITH, A. L. et al. Isolation and assay of rabies serogroup viruses in CER cells. **Intervirology**, v. 8, p. 92-99, 1977.

SMITH, J. S. Diagnosis - Overview. In: BAER, G. M., ed., **The Natural History of Rabies**, 2<sup>nd</sup> ed., Florida: CRC Press, 1991. p.201.

SOUZA, M. C. G.C. Rhabdoviridae. In: OLIVEIRA, L.H.S. **Virologia Humana**, Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994. p. 160-177.

STEELE, J. H.; FERNANDEZ, P. J. History of rabies and global aspects. In: BAER, G. M., ed., **The Natural History of Rabies**, 2<sup>nd</sup> ed., Florida: CRC Press, 1991. p. 1-24.

STOKER, M.; MACPHERSON, I. Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivatives. **Nature**, v. 203, n. 4952, p. 1355-1357, sep. 1964.

SUREAU, P. History of rabies: advances in research towards rabies prevention during the last 30 years. **Reviews of Infectious Diseases**. v.10, supplement 4, p. S581-S584, nov/dez 1988.

SUREAU, P.; RAVISSE P.; ROLLIN, P. E. Rabies diagnosis by animal inoculation, identification of Negri bodies, or Elisa. In: BAER, G. M., ed., **The Natural History of Rabies**, 2<sup>nd</sup> ed., Florida: CRC Press, 1991. p. 203-217.

TIERKEL, E. S.; ATANASIU, P. Rapid microscopic examination for Negri bodies and preparation of specimens for biological tests. In: MESLIN, F. -X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H., ed., **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>th</sup> ed., Geneva: World Health Organization, 1996, p. 55-65.

TSIANG, H. An in vitro study of rabies pathogenesis. **Bulletin de L'Institut Pasteur**, v. 83, p. 41-56, 1985.

TRIMARCHI, C. V.; DEBBIE, J. G. The fluorescent antibody in rabies. In: BAER, G. M., ed., **The Natural History of Rabies**, 2<sup>nd</sup> ed., Florida: CRC Press, 1991. p. 219-233.

TRIMARCHI, C.V.; SMITH, J. S. Diagnostic Evaluation. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**, San Diego: Academic Press, 2002. p. 307-349.

TUFFEREAU, C.; LAFAY, F.; FLAMAND, A. Biochemical analysis of rabies virus proteins in three persistently infected BHK-21 cell lines. **J. gen. Virol.**, v. 66, p. 159-169, 1985.

UMOH, J. U.; BLENDEN, D. C. Comparison of primary skunk brain and kidney and raccoon kidney cells with established cell lines for isolation and propagation of street rabies virus. **Infect. Immun.**, v. 41, n. 3, p. 1370-1372, sept. 1983.

VELLECA, W. M.; FORRESTER, F. T. **Laboratory Methods for Detecting Rabies**. Washington, DC: US Government Printing Office, 1981. 112p.

WEBSTER, W. A. A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis. **Can. J. Vet. Res.**, v. 51, p. 367-369, 1987.

WEBSTER, W. A.; CASEY, G. A. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: MESLIN, F. -X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H., ed., **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>th</sup> ed., Geneva: World Health Organization, 1996, p. 96-104.

WEBSTER, W. A.; CASEY, G. A.; CHARLTON, K.M. The mouse inoculation test in rabies diagnosis: early diagnosis in mice during the incubation period. **Can. J. Comp. Med.**, v. 40, p. 322-325, jul. 1976.

WEBSTER, W. A.; CHARLTON, K. M. The apparent infection of NA-C1300 cell cultures by nucleocapsid material of the Canadian Arctic strain of rabies virus. **Can. J. Microbiol.**, v. 35, p. 811-813, 1989.

WEBSTER, W. A.; CHARLTON, K. M.; CASEY, G. A. Growth characteristics in cell culture and pathogenicity in mice of two terrestrial rabies strains indigenous to Canada. **Can. J. Microbiol.**, v. 34, p. 19-23, 1988.

WHITFIELD, S. G. et al. A comparative study of fluorescent antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens. **Journal of Virological Methods**, v. 95, p. 145-151, 2001.

WHO. World Health Organization. Rabies. Epidemiology. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 02 jun. 2005a.

WHO. World Health Organization 2005. WHO Technical Report Series 931. **Expert Consultation on rabies**. First Report. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 02 jun. 2005b.

WIKTOR, T. J. Metodos de cultivo tisular. In: KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H., ed., **La Rabia – Tecnicas de laboratorio**, 3ª ed., Ginebra: Organizacion Mundial de la Salud, 1976, p. 105-129.

WILD, T. F.; BIJLENGA, G. A rabies virus persistent infection in BHK21 cells. **J. gen. Virol.**, v. 57, p. 169-177, 1981.

WOLDEHIWET, Z. Rabies: recent developments. **Research in Veterinary Science**, v. 73, p. 17-25, 2002.

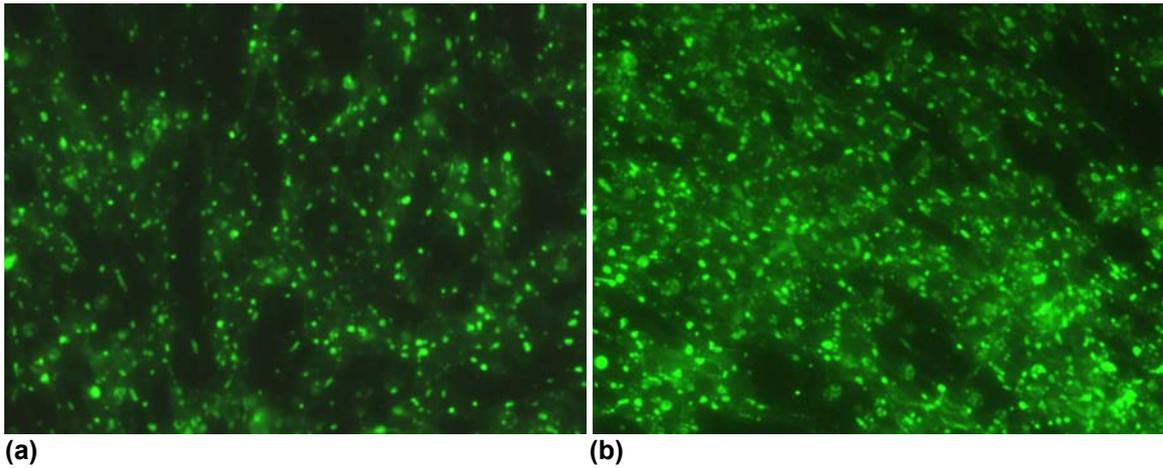
WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. **Clinica Chimica Acta**, v. 351, p. 49-63, 2005.

WUNNER, W. H. The chemical composition and molecular structure of rabies viruses. In: BAER, G. M., ed., **The Natural History of Rabies**, 2<sup>nd</sup> ed., Florida: CRC Press, 1991. p. 32-67.

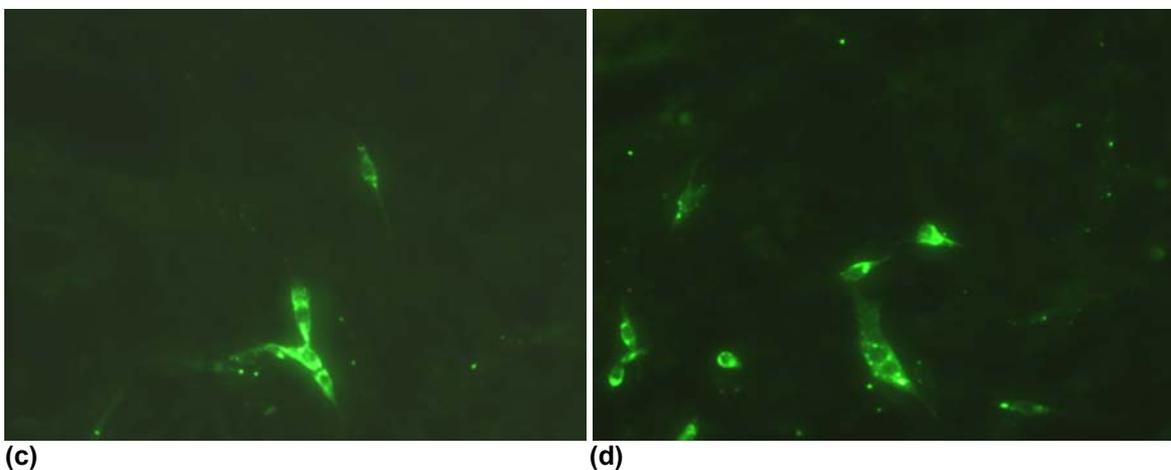
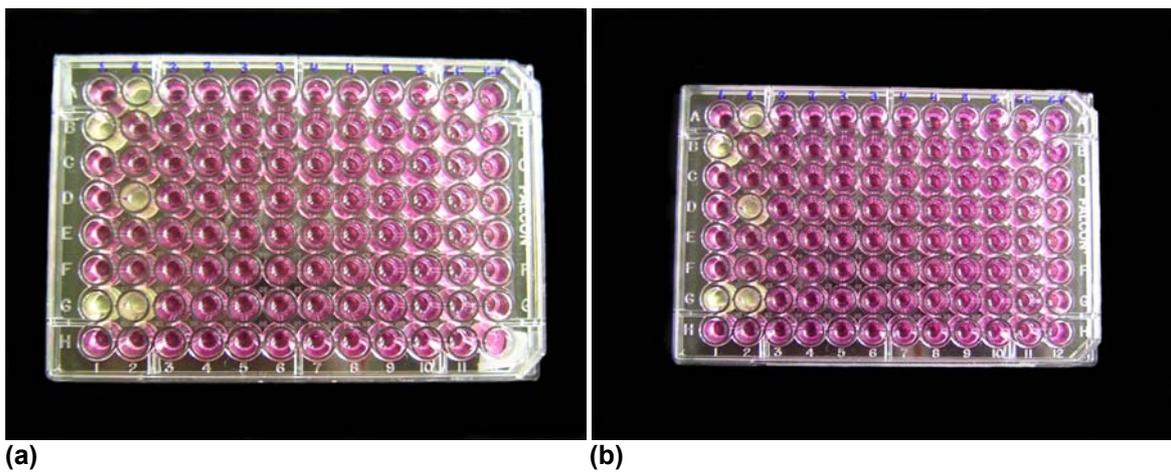
WUNNER, W. H. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**, San Diego: Academic Press, 2002. p. 23-77.

## 8. APÊNDICE

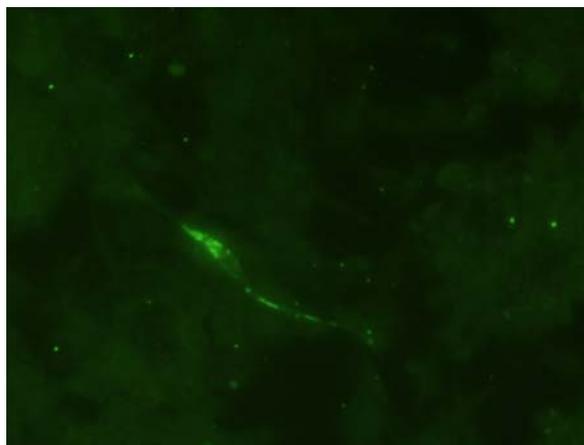
**Figura 1: Teste de IFD em células BHK-21 infectadas com vírus rábico fixo PV. (a) 72 h pós-infecção; (b) 96 h pós-infecção. Objetiva 20x.**



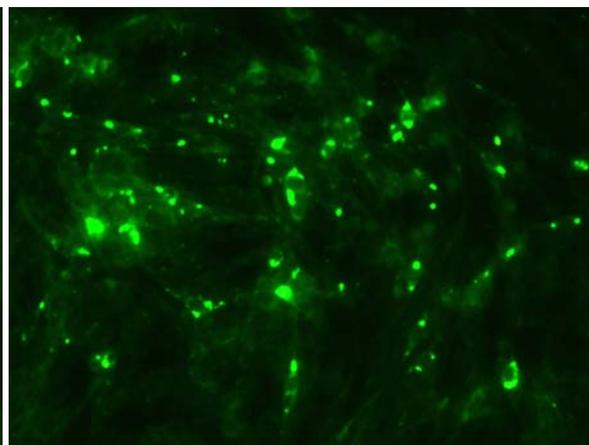
**Figura 2: (a) e (b): Placa de 96 poços contendo células BHK-21 inoculadas com amostra de vírus rábico de rua (Reg. 364/05). As colunas 1 e 2, à esquerda, onde podem ser notados 5 poços contaminados (cor amarela), são inoculadas com a diluição  $10^{-1}$ . (c) e (d): Teste de IFD em tapete celular inoculado com a diluição  $10^{-1}$  (Reg. 364/05), 48 e 72 h pós-inoculação, respectivamente. Objetiva 20x.**



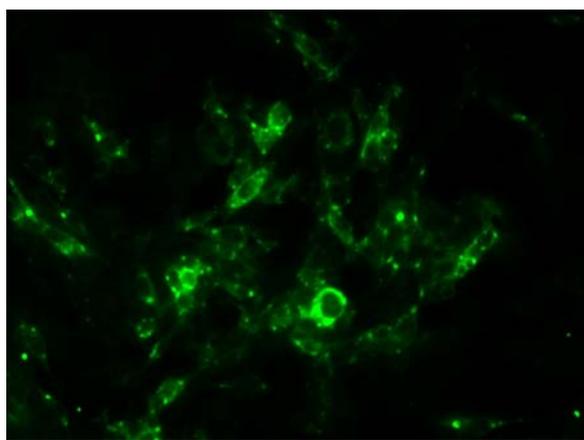
**Figura 3: Teste de IFD de células BHK-21 infectadas com vírus rábico de rua (Reg. 399/05), nas diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ , e controle positivo (vírus PV), 48 h pós-inoculação. Objetiva 20x.**



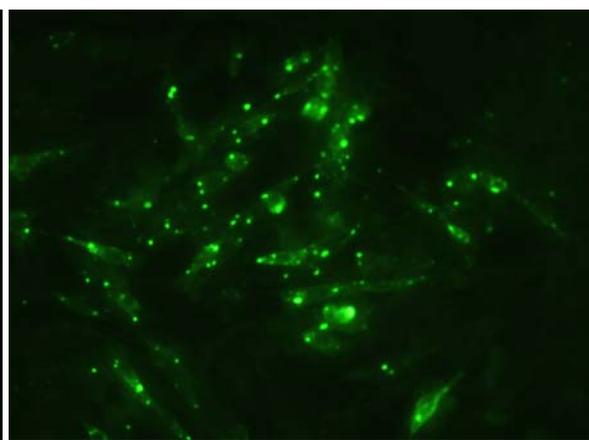
$10^{-1}$



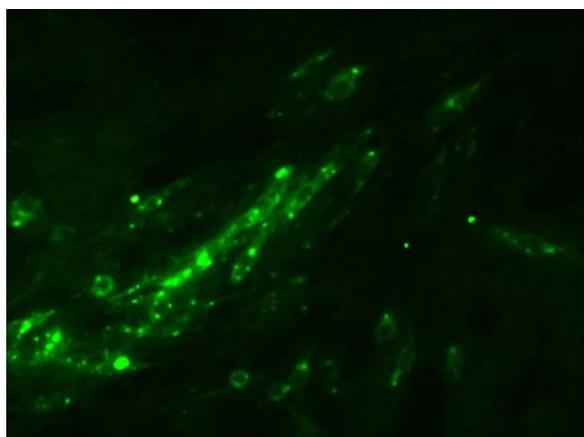
$10^{-2}$



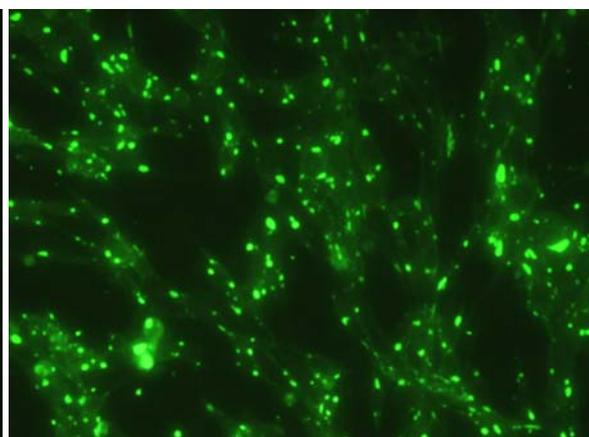
$10^{-3}$



$10^{-4}$

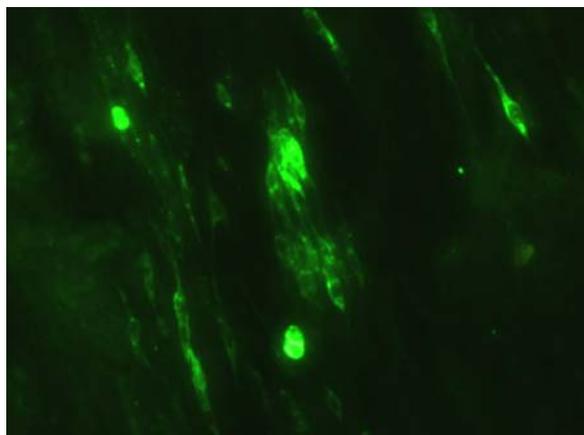


$10^{-5}$

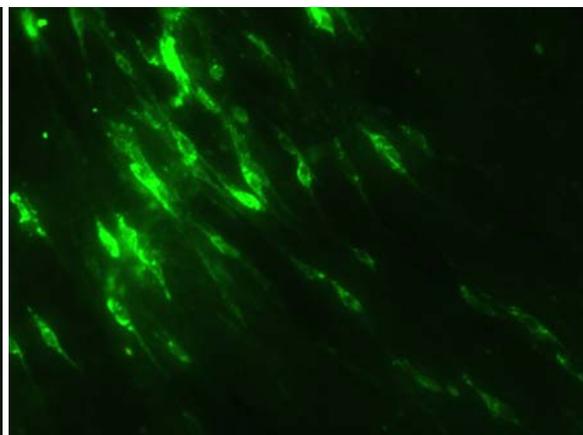


Controle positivo - PV

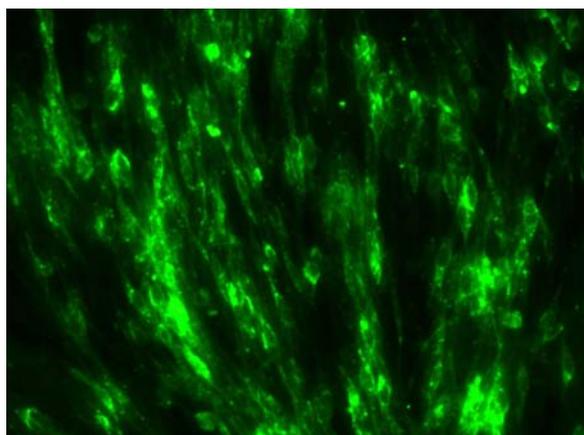
**Figura 3: Teste de IFD de células BHK-21 infectadas com vírus rábico de rua (Reg. 399/05), nas diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ , e controle positivo (vírus PV), 72 h pós-inoculação. Objetiva 20x.**



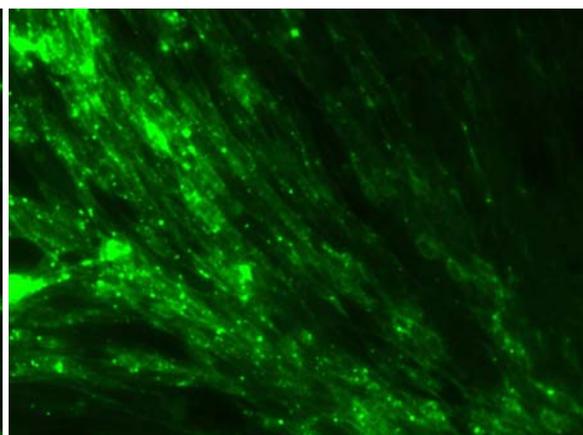
$10^{-1}$



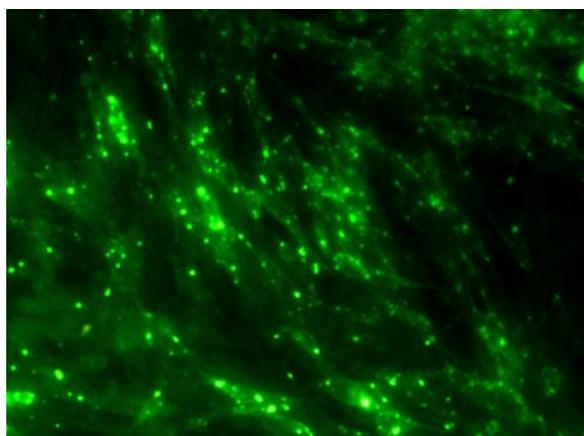
$10^{-2}$



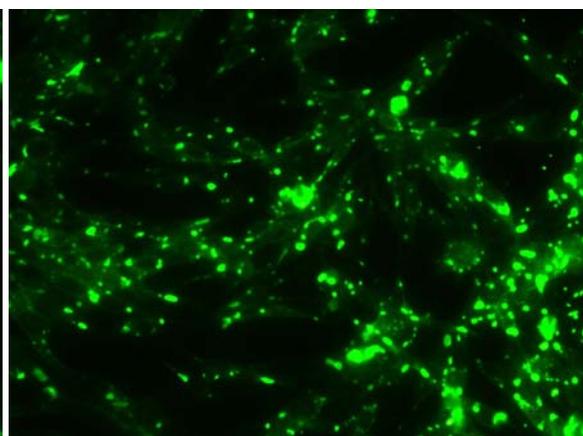
$10^{-3}$



$10^{-4}$

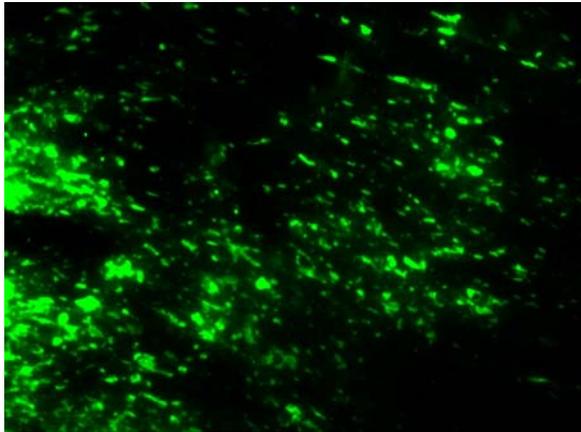


$10^{-5}$

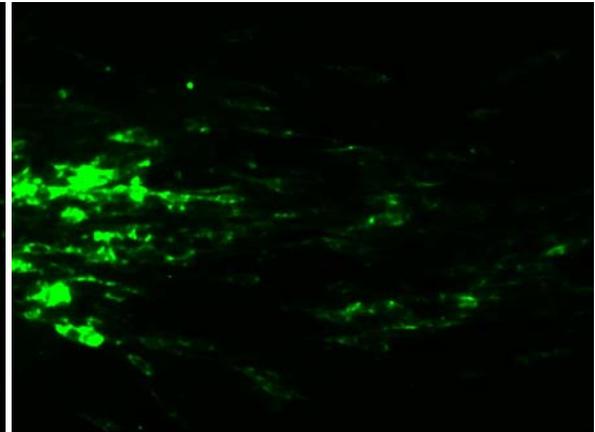


Controle positivo - PV

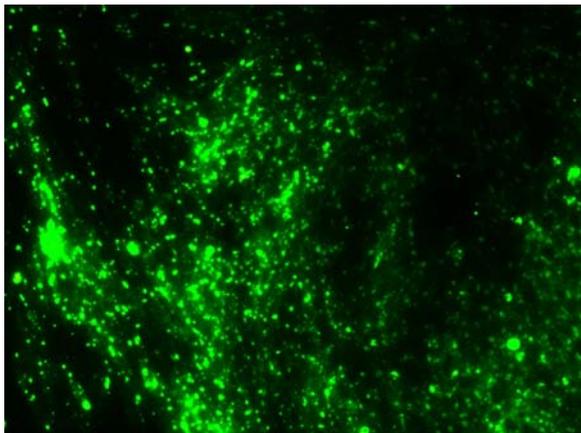
**Figura 3: Teste de IFD de células BHK-21 infectadas com vírus rábico de rua (Reg. 399/05), nas diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ , e controle positivo (vírus PV), 96 h pós-inoculação. Objetiva 20x.**



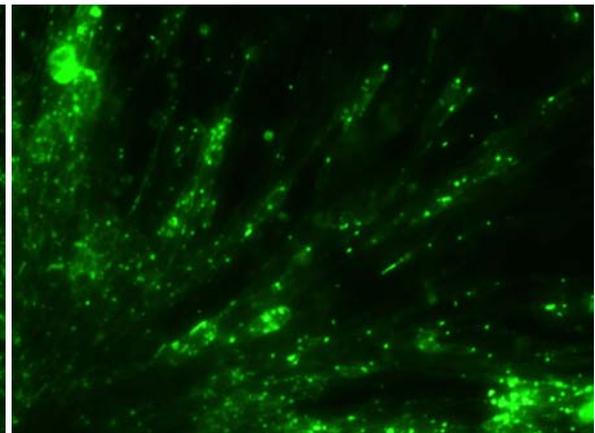
$10^{-1}$



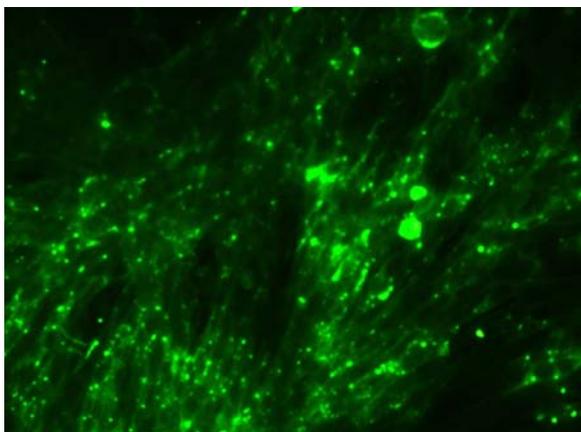
$10^{-2}$



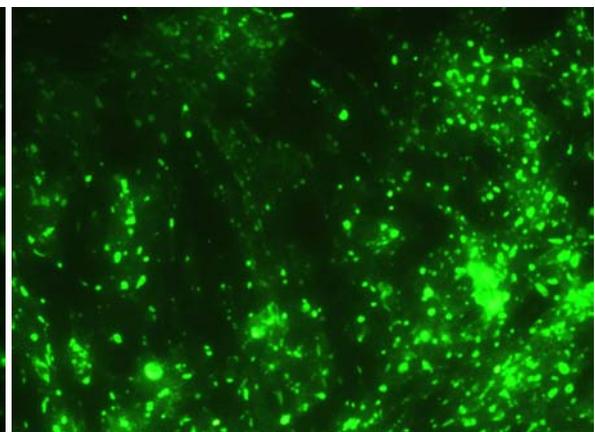
$10^{-3}$



$10^{-4}$



$10^{-5}$



Controle positivo - PV