

Comparação de períodos de observação no teste de inoculação em camundongos para o isolamento do vírus da raiva

Comparison of observation periods in mouse inoculation test for the isolation of rabies virus

Ana Carolina Nunes de Moraes^{I,*}

Claudius Couto Cabral^{II}

Alba Valéria de Almeida
Barcelos Dias^{III}

Marcela Garcia Araújo^{II}

Gláucio Luís Mata Mattos^{IV}

Wildeberg Cál Moreira^V

RESUMO

O teste de inoculação intracerebral em camundongos (IC) é rotineiramente utilizado no diagnóstico da raiva para ratificar o teste de imunofluorescência direta (IFD); no entanto não existe concordância sobre o tempo mínimo de observação dos animais. O objetivo do presente estudo foi avaliar a IC com confirmação por IFD, comparando o desempenho do diagnóstico em sete dias com aquele realizado em 21 dias de observação em camundongos lactentes e desmamados. Foram utilizadas 2.953 amostras de animais suspeitos, recebidas para diagnóstico de raiva no período de 2005 a 2011 na Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro. A análise estatística demonstrou elevada sensibilidade do diagnóstico (97,43%; 95,45%; 100%) e excelente concordância (99,76%; 99,29%; 98,71%) ao comparar os resultados na IFD com os obtidos em camundongos lactentes observados por sete e 21 dias e desmamados, respectivamente. Estes resultados inferem que a IC realizada em sete dias em camundongos lactentes possibilita a precocidade do diagnóstico de raiva, o que pode antecipar a tomada de decisões dos serviços de saúde envolvidos com o tratamento profilático antirrábico humano, bem como as ações dos serviços de vigilância epidemiológica da doença.

PALAVRAS-CHAVE: Raiva; Diagnóstico Laboratorial; Isolamento Viral; Inoculação em Camundongos; Saúde Pública

ABSTRACT

Mouse inoculation test (MIT) is routinely used in rabies diagnosis to attest the direct fluorescent antibody test (DFA), however there is no agreement on the minimum observation period. The aim of this study was to evaluate MIT with confirmation by DFA, comparing the diagnostic performance between seven and 21 days held in suckling and weaned mice. For this, 2,953 samples received for rabies diagnosis in the period of 2005-2011 by Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro were analyzed. Statistical analysis showed high diagnostic sensitivity (97.43%; 95.45%; 100%), and excellent agreement (99.76%; 99.29%; 98.71%) when comparing the results obtained in DFA with the results obtained from suckling mice observed along seven and 21 days and weaned mice respectively. These results infer that MIT performed in seven days using suckling mice enables early diagnosis of rabies, which can anticipate the decisions of health services involved with human prophylactic treatment services, as well as the epidemiological monitoring of rabies.

KEYWORDS: Rabies; Laboratory Diagnosis; Virus Isolation; Mouse Inoculation Test; Public Health

^I Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, Brasil

^{II} Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil

^{III} Unidade Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman” (UJV), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{IV} Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Concórdia, SC, Brasil

^V Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: nunesdemorais@ymail.com

Recebido: 08 mar 2014

Aprovado: 18 jun 2014



INTRODUÇÃO

Dentre as doenças infecciosas de origem viral, a raiva é única em relação a seu alcance e ao número de vítimas, uma vez que pode afetar todos os mamíferos, cursando com uma encefalite aguda capaz de levar as vítimas ao óbito em praticamente 100% dos casos^{1,2}. Trata-se de uma antroponose causada pelo vírus da raiva, pertencente à família Rhabdoviridae e gênero *Lyssavirus*, transmitida pela inoculação do vírus presente na saliva de animais infectados, principalmente por meio de mordeduras e, eventualmente, pela arranhadura e lambidura de mucosas ou pele lesada³.

Ao longo das últimas décadas, os esforços das autoridades de saúde pública determinaram a redução da incidência de raiva humana e animal nas regiões metropolitanas brasileiras. No entanto, a doença ainda é considerada endêmica no país, com prevalência variável de acordo com a região geopolítica. Atualmente, tem sido observado um aumento na detecção de casos de raiva em morcegos e animais de produção, bem como no número de casos de raiva humana transmitida por morcegos. Desta forma, os quirópteros têm sido apontados como os principais reservatórios do vírus na natureza, o que demonstra sua importância como fonte de infecção para os humanos, até mesmo em áreas historicamente livres da raiva^{4,5}. Os casos de raiva humana ainda representam grande desafio para a saúde pública. Terapias com finalidade profilática de pré-exposição são direcionadas a profissionais com risco ocupacional, enquanto a terapia de pós-exposição e a soroterapia são utilizadas em indivíduos expostos a injúrias por animais suspeitos^{7,8}.

O diagnóstico da raiva é de grande importância para orientar o tratamento profilático humano pós-exposição e para a adoção de medidas de controle da doença nas populações de animais domésticos⁶. O diagnóstico definitivo é baseado em procedimentos laboratoriais padronizados para amostras obtidas após a morte de animais suspeitos ou humanos⁷.

Em 1903, Adelchi Negri⁸ descreveu inclusões intracitoplasmáticas nos cérebros de animais raivosos, denominadas corpúsculos de Negri. A presença destas inclusões foi utilizada como o principal critério de diagnóstico por mais de 50 anos. Na década de 1930, Webster e Dawson⁹ introduziram a inoculação intracerebral de camundongos *Swiss Webster* para o isolamento do vírus da raiva. Em 1959, o grupo de Goldwasser adaptou o teste de anticorpos fluorescentes para o diagnóstico de raiva¹⁰. Atualmente, o método laboratorial preconizado é a detecção do antígeno viral pelo teste de imunofluorescência direta (IFD), que deve ser complementado pelo isolamento viral, a partir do teste de inoculação intracerebral em camundongos (IC) ou de inoculação em cultura de células (ICC)¹³⁻²⁰. Recentemente, outros testes têm sido utilizados para o diagnóstico de raiva, como os ensaios imunoenzimáticos e os moleculares¹¹.

Na maioria dos laboratórios de diagnóstico de raiva, que utilizam camundongos desmamados na IC, após a triagem por IFD, animais de três a quatro semanas de idade são inoculados com uma suspensão preparada a partir de amostras de Sistema Nervoso Central (SNC) de animais suspeitos, e ficam em observação por 21 dias¹⁴. Quando se trata de amostras positivas na IFD

em perfeito estado de conservação, o período de incubação nos camundongos desmamados inoculados é de cinco dias, podendo variar de quatro a 23 dias, de acordo com o gênero do animal suspeito^{12,13}. No entanto, a utilização de camundongos com até três dias de idade eleva consideravelmente a sensibilidade da prova, permitindo o isolamento do vírus em espécimes de baixa concentração viral^{14,15}. O uso de camundongos lactentes, além aumentar a sensibilidade reduz a duração do exame, sendo indicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que também propõe a redução do período de observação destes animais para três a quatro dias após a inoculação e posterior análise de seus cérebros por IFD. A OMS faz ressalvas ao uso de camundongos adultos, que só deve ocorrer em último caso^{9,14}. A Organização Internacional de Epizootias (OIE) propõe que, para a obtenção de resultados mais rápidos, pode-se analisar o cérebro de camundongos por IFD nos dias 5, 7, 9 e 11 pós-inoculação^{9,15,16}.

A IC ainda hoje é considerada um método eficaz para isolar o vírus da raiva na rotina laboratorial, principalmente nos casos em que não há infraestrutura adequada para a implantação do diagnóstico utilizando ICC. Embora possibilite o diagnóstico precoce, não há consenso sobre o período mínimo de observação dos animais na rotina laboratorial^{14,17,26}. O objetivo do presente estudo foi comparar os resultados obtidos em três testes de inoculação em camundongos com confirmação pela IFD.

METODOLOGIA

Estudo retrospectivo

Foi realizado um levantamento retrospectivo das amostras recebidas para diagnóstico de raiva no período de 2005 a 2011 na Subgerência de Virologia da Unidade Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”, da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro (UJV/SMS-RJ). Foram registradas 3.120 amostras provenientes de diferentes espécies animais.

Amostras examinadas

Para determinar quais amostras poderiam ser utilizadas no presente estudo, foi considerado como critério de inclusão o registro completo de dados referentes à execução da rotina laboratorial, o que fez com que 167 amostras fossem descartadas. Desta forma, 2.953 amostras submetidas simultaneamente à IFD e à IC foram incluídas no estudo.

Animais de laboratório

Foram utilizados camundongos *Swiss Webster* machos e fêmeas, com idade de um a três dias (lactentes) e desmamados com três a quatro semanas. Todos os animais foram provenientes de uma colônia convencional *outbreed* e fornecidos pela Seção de Biotério da UJV/SMS-RJ. Os animais foram alojados em gaiolas apropriadas com água e ração *ad libitum* e mantidos sob temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$, cerca de 70% de umidade relativa e fotoperíodo 12:12h).



Protocolo do Teste de Inoculação em Camundongos

As amostras utilizadas no presente estudo foram submetidas à rotina de diagnóstico laboratorial da Subgerência da Virologia da UJV/SMS-RJ. Para isto, amostras de SNC de animais suspeitos, acompanhadas de prontuário com dados epidemiológicos referentes ao animal, foram acondicionadas em placas de Petri e armazenadas sob temperatura de $-18 \pm 4^\circ\text{C}$ em *freezer*, por um período máximo de 24 horas até o exame.

Foram utilizados fragmentos de SNC (córtex, hipocampo, cerebelo e no caso de herbívoros, também medula) para o preparo de lâminas e inóculos (suspensão a 10% do tecido nervoso em salina fisiológica contendo penicilina 100 UI e estreptomicina 2 mg/mL). O diagnóstico laboratorial foi realizado empregando-se IFD e IC, de acordo com o método preconizado^{13,14,18,19}. O diagnóstico de raiva seguiu os princípios éticos do uso de animais^{20,21}, sob a licença nº 83/12 do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil – CEP SMSDC-RJ.

Para amostras de herbívoros foi realizada uma estimativa de positividade na IFD, com graduação crescente de 1 (uma) a 4 (quatro) cruces para cada estrutura examinada, baseada na intensidade da fluorescência à microscopia. Quando não foi detectada fluorescência, o fragmento foi considerado negativo.

Tratamento das amostras

De acordo com o resultado da IFD, três diferentes tratamentos foram dados às amostras:

Grupo 1 (Amostras de carnívoros, herbívoros, quirópteros e outros gêneros): a suspensão foi inoculada via intracerebral em um grupo de camundongos lactentes ($n = 12$) com volume de 0,02 mL. Os animais foram observados por sete dias e, ao final deste período, submetidos à eutanásia em câmara anestésica com gás halotano. Os cérebros foram coletados para o preparo de impressões de aproximadamente 5 mm de diâmetro para a confirmação do diagnóstico por IFD.

Grupo 2 (Amostras de carnívoros, herbívoros, quirópteros e outros gêneros): a suspensão foi inoculada em um grupo de camundongos lactentes ($n = 12$), com volume de 0,02 mL, observados por 21 dias. Estruturas cerebrais daqueles que foram a óbito a partir do quinto dia após a inoculação foram coletadas para o preparo de impressões e confirmação do diagnóstico por IFD. Para os Grupos 1 e 2, foram considerados positivos para a raiva todos os animais cujas estruturas cerebrais revelaram fluorescência característica à IFD.

Grupo 3: para todas as amostras positivas na IFD, independente do gênero, a suspensão também foi inoculada via intracerebral com volume de 0,03 mL em um grupo de camundongos desmamados ($n = 8$). Os animais foram observados por 21 dias e, neste período, não foi realizada coleta de estruturas cerebrais, sendo considerados positivos para raiva todos os animais que, a partir do quinto dia após a inoculação, apresentaram sintomatologia neurológica com evolução para paralisia e morte.

Análise estatística

Os resultados obtidos da observação dos animais dos Grupos 1, 2 e 3 foram comparados entre si para verificar a concordância entre os tratamentos. Com a positividade calculada em camundongos lactentes dos Grupos 1 e 2 e a mortalidade no Grupo 3, procedeu-se à análise estatística. A sensibilidade, a especificidade e os valores preditivo positivo e negativo do teste de inoculação em camundongos, realizados em sete dias, foram avaliados em comparação com a IFD e o método realizado em 21 dias, e com a observação de camundongos desmamados. Para comparar o grau de concordância dos métodos diagnósticos foi utilizada a correlação linear com intervalo de confiança de 95%, e ainda o Qui-quadrado e o coeficiente de Kappa²². Um cálculo amostral foi realizado para verificar a representatividade do número de amostras^a. Para a execução da análise estatística foram utilizados os *Softwares* Microsoft® Excel e SPSS®.

RESULTADOS

Durante o período de 2005 a 2011, foram recebidas 3.120 amostras de diferentes gêneros animais, sendo a maioria proveniente de caninos (44,10%). Para a execução do presente estudo foram consideradas 2.953 amostras, dentre as quais 163 (5,22%) foram positivas para a raiva em pelo menos uma das provas de diagnóstico. Dentre as amostras positivas, a maioria foi proveniente de bovinos (70,55%). A distribuição das amostras quanto ao gênero está apresentada na Tabela 1.

As 2.953 amostras utilizadas foram separadas em três estratos de acordo com os testes laboratoriais a que foram submetidas na rotina de diagnóstico: IFD e IC em lactentes com observação por sete dias (IC-7); IFD, IC-7 e IC com observação por 21 dias (IC-21); e IFD, IC-7 e IC em desmamados observados por 21 dias (IC-D). O cálculo amostral demonstrou que o número de amostras analisado foi representativo para a positividade (margem de erro 1% e nível de confiança 99%).

IFD e IC em lactentes com observação por sete dias

Cento e cinquenta e quatro (5,22%) amostras foram positivas para a raiva na IFD e 160 (5,42%) na IC em camundongos lactentes observados por sete dias. A concordância de resultados foi

Tabela 1. Amostras para diagnóstico de raiva por gênero entre 2005 a 2011.

Gênero	Nº amostras	%	Positivos	%
Canino	1.376	44,10	0	0
Felino	479	15,35	0	0
Bovino	369	11,83	115	70,55
Quiróptero não Hematófago	358	11,50	14	8,60
Quiróptero Hematófago	271	8,67	5	3,07
Equino	112	3,60	26	15,95
Outros	155	4,97	3*	1,84
Total	3.120	100,00	163	100

*Dois ovinos e um suíno.



de 99,76%, com divergência entre sete (0,24%) amostras. Não houve diferença estatística significativa entre as duas técnicas ($p < 0,05$). Embora não significativa, a positividade foi maior na inoculação em camundongos observados por sete dias em comparação com a IFD, como pode ser observado na Tabela 2.

IFD e IC em lactentes com observação por sete e 21 dias

Para esta avaliação foram examinadas 980 amostras, sendo 936 (95,51%) negativas e 44 (4,49%) positivas por IFD. Na IC, 935 (95,41%) foram negativas e 45 (4,59%) positivas nos dois períodos de observação. Sete (0,71%) amostras apresentaram resultados divergentes, sendo uma (0,10%) positiva na IFD e negativa na IC. Cinco (0,51%) foram negativas na IFD e positivas na IC-7 e IC-21. Uma (0,10%) sexta amostra apresentou resultado positivo na IFD e IC-7 e negativo na IC-21. Das 980 amostras comparadas com a IC em camundongos lactentes, observou-se concordância entre 973 amostras (99,29%). Das amostras negativas na IFD, a IC foi capaz de detectar cinco como positivas (Tabela 3).

Tabela 2. Positividade do diagnóstico de raiva por IFD e IC em camundongos por ano.

Ano	IFD ¹		IC-7	
	Positivo/Total	%	Positivo/Total	%
2005	59/837	7,05	60/837	7,17
2006	51/558	9,14	50/558	8,96
2007	15/415	4,10	18/415	4,34
2008	7/407	1,72	7/407	1,72
2009	4/248	1,61	5/248	2,02
2010	10/239	4,20	11/239	4,60
2011	8/249	3,21	9/249	3,61
Total	154/2.953	5,22	160/2.953	5,42

¹Imunofluorescência direta. n = 2.953

IFD e IC em lactentes com observação por sete dias e com desmamados por 21 dias

Neste estrato foram agrupadas 78 amostras, quatro (5,13%) negativas e 74 (94,87%) positivas pelo teste de IFD. Houve divergência de resultados em seis (7,70%) amostras e concordância entre 72 (92,30%). Uma (1,28%) amostra positiva na IFD foi negativa nos dois grupos de camundongos. Uma (1,28%) foi positiva na IFD e IC-7 e negativa na IC-D. Outras quatro (5,13%) amostras negativas na IFD foram positivas na IC nos dois períodos de observação. Comparando os grupos 1 e 3, constatou-se que em 77 amostras (98,71%) os resultados foram idênticos. Somente uma amostra apresentou resultados divergentes quando avaliada em camundongos lactentes e desmamados (Tabela 4).

As amostras que apresentaram resultados discordantes na IC em camundongos lactentes foram discriminadas e caracterizadas, considerando o gênero animal, o estado de conservação e a estimativa de positividade na IFD dos fragmentos cerebrais (Tabela 5).

Todos os testes estatísticos realizados demonstraram que houve concordância entre os resultados da observação por sete dias em camundongos lactentes com IFD e IC. Entre os Grupos 1 e 3 de camundongos foi superior à observada entre os Grupos 1 e 2. O teste de Qui-quadrado (0,000; 0,000; 0,000) indica que não existe diferença entre os grupos. A proporção de concordância calculada pelos valores de Kappa na IFD e IC-21 (0,96; 0,95) foi excelente, enquanto na IC-D (0,66), foi considerada como substancial. O valor de Rho do coeficiente de correlação de Spearman também comprovou a similaridade entre a IC-7 e as demais provas de diagnóstico (Tabela 6).

Tabela 3. Positividade do diagnóstico de raiva por gênero na IFD e IC com observação por sete e 21 dias em lactentes.

Gênero	IFD ¹		IC-7		IC-21	
	Positivo/Total	%	Positivo/Total	%	Positivo/Total	%
Bovino	37/173	21,39	38/173	21,97	37/173	21,39
Equino	4/64	6,25	3/64	4,69	3/64	4,69
Quiróptero não hematófago	2/331	0,60	2/331	0,60	2/331	0,60
Quiróptero hematófago	0/263	0	1/263	0,38	1/263	0,38
Outros	1/149	0,67	1/149	0,67	1/149	0,67
Total	44/980	4,49	45/980	4,59	44/980	4,49

¹Imunofluorescência direta. n = 980

Tabela 4. Positividade do diagnóstico de raiva por gênero na IFD e IC com observação em lactentes por sete e 21 dias em desmamados.

Gênero	IFD ¹		IC-7		IC-D	
	Positivo/Total	%	Positivo/Total	%	Positivo/Total	%
Bovino	47/47	100	47/47	100	46/47	97,87
Equino	16/20	80	19/20	95	19/20	95
Quiróptero não hematófago	8/8	100	8/8	100	8/8	100
Quiróptero hematófago	2/2	100	2/2	100	2/2	100
Outros	1/1	100	1/1	100	1/1	100
Total	74/78	94,87	77/78	98,72	76/78	97,44

¹Imunofluorescência direta. n = 78



Tabela 5. Amostras discordantes na IC de acordo com gênero, estado de conservação e estimativa de positividade. (n = 8)

Registro	Gênero	Conservação	Tecido/Estimativa de Positividade IFD				Teste de inoculação em camundongos		
			Hipocampo	Cerebelo	Córtex	Medula	7	21	Desmamado
102/05	Bovino	Boa	nr	nr	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	nr
147/06	Bovino	Boa	Negativo	Negativo	++	nr	Positivo	Negativo	Negativo
245/06	Equino	Boa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
322/06	Equino	Boa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	nr	Positivo
511/06	Equino	Ruim	+	++	++	+++	Negativo	Negativo	Negativo
225/07	Equino	Boa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
173/09	Quiróptero hematófago	Boa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	nr
025/11	Equino	Boa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	nr	Positivo

¹nr: não realizado.

O diagnóstico em sete dias apresentou alta sensibilidade e especificidade ao considerar a IFD e IC-21 e IC-D como técnicas padrão. Os valores preditivos positivo e negativo também foram elevados, demonstrando a segurança da IC em camundongos lactentes observados por sete dias. As diferenças entre os períodos de observação não foram significativas e os resultados foram altamente correlacionados (Tabela 6).

Todos os parâmetros de validação da IC-7 analisados demonstraram a baixa variabilidade dos ensaios. Os resultados da análise da variância do modelo de regressão da positividade da IC-7 revelaram que a relação entre os resultados foi altamente correlacionada com grande significância ($F = 365,357; 465,065; p = 0,000$) (Tabela 7).

Tabela 6. Descritores estatísticos para os resultados obtidos na IC em camundongos em lactentes observados por sete dias (Grupo 1) e as técnicas padrão.

Método estatístico	IFD ¹	Grupo 2 ²	Grupo 3 ³
Qui-Quadrado	0,000	0,000	0,000
Kappa	0,960	0,952	0,661
Spearman	nr ⁴	0,620	0,592
Especificidade	99,71	99,78	50,00
Sensibilidade	97,43	95,45	100,00
Valor Preditivo Positivo	95,00	95,45	98,70
Valor Preditivo Negativo	99,86	99,78	100,00
Acurácia	99,60	99,60	98,72

¹Imunofluorescência direta. ²Teste de inoculação em camundongos lactentes observados por 21 dias. ³Teste de inoculação em camundongos desmamados. ⁴Não realizado.

DISCUSSÃO

A obtenção de resultados confiáveis na IC depende de sua precisão e execução e, para evitar confusão devido a mortes por causas inespecíficas, é recomendado o uso combinado de IC e IFD. Apesar de ser considerada uma técnica eficaz, a IC em camundongos desmamados é demorada, sendo, portanto, recomendável substituí-la por uma técnica que utilize neonatos, sabidamente mais sensíveis ao vírus^{14,26}. O presente estudo demonstrou que a positividade das amostras no grupo de camundongos lactentes observados por sete dias foi semelhante à do grupo da mesma faixa etária avaliado por 21 dias e ao percentual de mortalidade encontrado no grupo de desmamados. Desta forma, é possível antecipar o diagnóstico em 14 dias, o que pode ser de grande valia principalmente para casos que envolvem seres humanos.

A IC em camundongos lactentes foi capaz de diagnosticar como positivas seis amostras negativas para a raiva no primeiro exame, o que reforça a necessidade da IFD ser complementada pelo isolamento viral conforme preconização para o diagnóstico de raiva^{9,14,27}. O diagnóstico em sete dias demonstrou melhor desempenho para estes materiais, pois uma amostra positiva na IC-7 foi negativa na IC-21 e apresentou positividade de 6,45%, confirmando tratar-se de um espécime de baixa concentração viral. Uma situação como esta poderia causar prejuízo à saúde pública caso fosse utilizada observação por 21 dias, mesmo em camundongos lactentes, altamente sensíveis ao vírus da raiva²⁴⁻²⁶. Houve detecção precoce da positividade na IC-7 e possivelmente o título viral estaria baixo no SNC e na glândula salivar, principal órgão envolvido na transmissão do vírus^{9,22,23}.

Tabela 7. Análise da variância (ANOVA) do modelo de regressão linear da positividade da IC em camundongos lactentes observados por sete dias¹.

ANOVA										
Modelo	Soma Quadrática		Grau de Liberdade		Média Quadrática		F		p	
	IC-21 ²	IC-D ³	IC-21	IC-D	IC-21	IC-D	IC-21	IC-D	IC-21	IC-D
Regressão	23,46	37,45	1	1	23,46	37,45	365,35	465,06	0,000	0,000
Residual	4,62	6,12	72	76	0,06	0,08	-	-	-	-
Total	28,09	43,57	73	77	-	-	-	-	-	-

¹Variável dependente. ²Teste de inoculação em camundongos lactentes observados por 21 dias. ³Teste de inoculação em camundongos desmamados observados por 21 dias.



A validação de ensaios analíticos é o processo em que se estabelecem os seguintes itens: precisão, acurácia, linearidade, gama, limite de detecção e quantificação, especificidade e robustez, conforme apropriado ao tipo de ensaio. Os bioensaios, que envolvem animais e células, apresentam resultados variáveis e podem ter amplos limites de aceitação. Além disso, os ensaios em animais são demorados e apresentam maior dificuldade por envolverem o cuidado, a manutenção e o manuseio²⁴.

A precisão do diagnóstico de raiva depende do estado de conservação da amostra, das áreas do cérebro coletadas e da distribuição do vírus nas mesmas, que pode ser irregular²⁰. A conservação da amostra é um ponto crítico para o diagnóstico rápido e acurado. Materiais submetidos a manejo inadequado envolvendo coleta, armazenamento e envio ao laboratório podem ter perda da viabilidade viral capaz de prejudicar a acurácia do diagnóstico²⁵. Tais informações podem explicar o fato de duas amostras terem apresentado baixa estimativa de positividade na IFD e resultados discordantes entre as provas, semelhante ao observado em uma amostra positiva na IFD e em sete dias de observação, e negativa em 21 dias. Estes achados indicaram a precocidade e a segurança do diagnóstico em sete dias e foram confirmados pelos parâmetros de validação da IC-7²⁶.

Os valores apresentados nas Tabelas 6 e 7 demonstram boa correlação entre a IC-7 e as demais provas biológicas, mesmo em casos em que o exame foi negativo na IFD e na observação por 21 dias. Isto indica que, mesmo com cuidado e disciplina para manter elevado grau de precisão no diagnóstico laboratorial, outros fatores podem interferir na realização do exame, conforme o ocorrido para uma única amostra positiva na IFD, que foi negativa nas três provas biológicas. É possível que com a autólise tecidual *post-mortem*, tenha ocorrido redução na viabilidade do vírus, dificultando seu isolamento. Os resultados aqui apresentados sugerem que um resultado negativo na IFD de amostras de animais suspeitos, quando em boas condições de preservação, representam baixo risco para a saúde de indivíduos expostos, dada a possibilidade de detecção precoce de positividade no sétimo dia de observação^{34,37,40}.

A IC em camundongos lactentes observados por sete dias apresentou alta sensibilidade (Tabela 6), o que é desejável para ensaios biológicos envolvendo células ou animais, que podem apresentar variabilidade acima de 50,00%^{27,38}. Este resultado evidenciou a elevada capacidade da técnica em identificar amostras verdadeiramente positivas em comparação com as técnicas padrão. Tal característica é de extrema importância, pois orienta as ações de Vigilância Epidemiológica nas regiões onde estejam ocorrendo surtos da doença, possibilita a intervenção quanto à circulação do agente viral em quirópteros, além de oferecer auxílio para casos onde é indicado o tratamento profilático humano pós-exposição^{6,28,29}.

A elevada concordância revelada pela regressão linear e análise da variância (Tabela 7) pôde ser atribuída à utilização de camundongos lactentes em ambos os testes diagnósticos^{14,26,34}. Os resultados corroboraram a superioridade da IC em camundongos lactentes observados por sete dias, relatada por outros autores,

uma vez que permitiu diagnosticar como positivos espécimes contendo concentração viral possivelmente baixa, ou até mesmo amostras que foram negativas na IFD e IC com observação por 21 dias^{24,25,30}. O atraso no diagnóstico poderia representar um grave problema de saúde pública⁴⁰. A IC-21, sendo um teste demorado, teria apenas valor acadêmico, principalmente no que se refere à decisão de iniciar o tratamento pós-exposição⁴⁴.

A maior parte das amostras positivas foi proveniente de herbívoros. Embora raramente apresentem comportamento agressivo, quando acometidos pela raiva são fontes de infecção em potencial principalmente para veterinários e tratadores, onde o risco depende do tipo de contato a que forem submetidos, como por exemplo, na manipulação da cavidade oral destes animais⁴². Além disso, o número de herbívoros diagnosticados positivos para a raiva tem aumentado nos últimos anos, o que demonstra a importância do ciclo rural na epidemiologia da doença. Desta forma, estes animais podem ser considerados sentinelas para o monitoramento da circulação do vírus da raiva na natureza⁴.

A presença do vírus da raiva em populações sinantrópicas de morcegos tem sido relatada nos últimos anos. Corroborando com esta mudança na epidemiologia da doença, depois dos herbívoros, os quirópteros foram os animais diagnosticados como positivos em maior número. A circulação viral nestes animais representa grave risco à saúde humana e animal, e requer atenção e medidas de controle e prevenção principalmente pelas autoridades de saúde pública³¹.

Embora vários métodos de diagnóstico *post-mortem* já tenham sido publicados, três técnicas de referência são atualmente recomendadas pela OMS e pela OIE, a IFD, a IC ou a ICC¹³⁻²⁰. A maioria dos laboratórios utiliza a IFD como primeira prova e apresentam resultados discordantes (falso negativos) entre esta técnica e a IC em percentual acima do encontrado no presente estudo (< 1,0%). A ICC e a IC são as técnicas com a menor proporção de falsos resultados positivos, com ótima especificidade^{32,33}.

De acordo com as normas da OMS, as técnicas de diagnóstico são classificadas em quatro categorias principais: microscopia eletrônica e de imunofluorescência, técnicas enzimáticas e radioimunoensaio³⁴. No entanto, a disponibilidade de instrumentos de ponta como o microscópio eletrônico e outros sistemas de microscopia, nos países em desenvolvimento ainda é limitada³⁵. O mesmo ocorre com os métodos genômicos, que poderiam ser aplicados ao diagnóstico, porém possuem custo elevado e requerem estrutura laboratorial específica, o que dificulta sua implementação. Desta forma, pode ser necessária a substituição por outros métodos disponíveis para o diagnóstico específico de infecções virais^{36,37,43}. A IC é considerada eficaz para o isolamento do vírus da raiva^{38,39} e, portanto, sempre deve ser considerada para a confirmação do procedimento da IFD^{40,49,52}. Este ensaio pode ser utilizado em situações em que as instalações para cultura de células não estejam disponíveis^{27,37,41}. Além disso, não há conformidade geral de opiniões com relação à sensibilidade da ICC. Alguns estudos comparativos a descrevem como tão sensível quanto a IC, no entanto, outros relatam ser menos sensível^{41,42,43}.



As técnicas para fins de diagnóstico devem ser adequadas para utilização em todos os países, especialmente naqueles em que técnicas sofisticadas, que utilizem instrumentação cara, sejam inviáveis^{43,52}. Diferentemente da ICC, a IC-7 não necessita de grande aparato laboratorial para ser utilizada como rotina de diagnóstico. No Brasil, nenhum dos 33 laboratórios de diagnóstico de raiva faz ICC, ou seja, todos utilizam camundongos no isolamento viral. A raiva é uma zoonose que ainda representa ameaça à Saúde Pública. O diagnóstico rápido e eficaz e a adoção de medidas preventivas adequadas são particularmente importantes, principalmente em regiões endêmicas como a África e a Ásia⁴³. Qualquer laboratório que realize a prova padrão está equipado para executar a IC-7, o que, para países em desenvolvimento como o Brasil, que também possui dimensões continentais, e outros países na mesma condição é perfeitamente praticável.

Em casos de possível exposição ao vírus da raiva, cérebros de animais suspeitos são enviados a laboratórios centrais para o diagnóstico, e o tratamento de pós-exposição instituído enquanto se aguarda o resultado final, o que pode levar muitos dias ou semanas. Sendo assim, o diagnóstico em sete dias seria ideal, pois muitos destes tratamentos pós-exposição poderiam ser evitados se a suspeita do animal estar acometido por raiva fosse descartada pelo uso de testes simples e rápidos que podem ser realizados em pequenos laboratórios periféricos^{44,49}.

A utilização de camundongos lactentes na rotina de diagnóstico oferece vantagens ao sistema de Saúde, principalmente ao considerar os casos onde é indicado tratamento profilático humano completo

com cinco doses de vacina de cultivo celular. No Brasil são realizados em média 400 mil atendimentos por ano envolvendo a profilaxia da raiva humana. Cada dose de vacina de cultivo celular apresenta o custo médio de R\$ 21,63⁴⁵. Assim, a assistência a pacientes envolvidos em acidentes com animais suspeitos representa alto custo para o Sistema Único de Saúde (SUS), responsável pelo oferecimento de imunobiológicos à rede de Saúde. Antecipando o diagnóstico para sete dias, o esquema vacinal poderia ser reduzido para duas ou três doses nos casos diagnosticados negativos e confirmados pela IC-7. Tal medida auxiliaria na redução dos gastos públicos, além de minimizar o trauma físico e psicológico ao qual pessoas envolvidas em acidentes com animais suspeitos são expostas³⁷.

CONCLUSÃO

A IC-7 pode ser utilizada como teste confirmatório da raiva o que ainda é uma tarefa desafiadora para os laboratórios de diagnóstico. Este procedimento permite a detecção precoce do vírus da raiva e pode ser empregado como método alternativo confiável em laboratórios que não possuem infraestrutura adequada para a cultura de tecidos. Estes estudos abrem ainda perspectivas para o diagnóstico e podem ajudar médicos e seus pacientes, devido à detecção precoce de vírus em amostras suspeitas, possibilitando a intervenção oportuna na profilaxia antirrábica pós-exposição. Os resultados do presente estudo inferem que a prova biológica realizada em sete dias em camundongos lactentes possibilita a precocidade do diagnóstico de raiva, o que é de grande valia sob a ótica laboratorial e de saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Consales CA, Bolzan VL. Rabies review: immunopathology, clinical aspects and treatment. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2007;13(1):5-38. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992007000100002>
2. Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T. Rabies re-examined. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(6):327-43. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00287-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00287-6)
3. Acha PN, Szyfres B, editors. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3a ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud; 2003. Volume 2, Parte II, Rabia; p. 351-83. (Publicación científica y técnica; 580).
4. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Normas técnicas de profilaxia da raiva humana. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
5. Morikawa VM, Ribeiro J, Biondo AW, Fellini A, Bier D, Molento MB. Cat infected by a variant of bat rabies virus in a 29-year disease-free urban area of southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(2):255-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000200022>
6. SVS em Rede. Especial Raiva. Brasília: Ministério da Saúde; 2010 [acesso em 20 jan 2011]. Disponível em: http://dtr2001.saude.gov.br/ascom/svs_informa/index_esp_raiva.html
7. Organização Panamericana de Saúde. Casos de raiva humana. Washington: Organização Panamericana de Saúde; 2013 [acesso em 7 set 2013]. Disponível em: <http://siepi.panaftosa.org.br/Export.aspx>
8. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de diagnóstico laboratorial de raiva. Brasília; 2008 [acesso em 30 jan 2011]. (Série A. Normas e manuais técnicos). Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_diagnostico_laboratorial_raiva.pdf
9. World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies: second report. Geneva: World Health Organization; 2013 [acesso em 12 set 2013]. (WHO technical report series; 982). Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85346/1/9789240690943_eng.pdf
10. Negri A. Beitrag zum Studium der Aetiologie der Tollwut. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig*. 1903;43:507-28.
11. Webster LT; Dawson JR. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Exp Biol Med*. 1935;32(4):570-3. <http://dx.doi.org/10.3181/00379727-32-7767P>



12. Goldwasser RA, Kissling RE, Carski TR; Hosty TS. Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in the salivary glands of rabid animals. *Bull World Health Organ.* 1959;20(4):579-88.
13. Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P. The fluorescent antibody test. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowsky H, editors. *Laboratory techniques in rabies.* 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. Chapter 7; p. 88-95.
14. Koprowsky H. The mouse inoculation test. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowsky H, editors. *Laboratory techniques in rabies.* 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. Chapter 6; p. 80-7.
15. World Health Organization. Expert committee on rabies. Geneva: World Health Organization; 1992. (Technical report series; 824)
16. Swovel PT, Johnson KP. Enhancement of fluorescent antibody staining of viral antigens in formalin-fixed tissues by trypsin digestion. *J Infect Dis.* 1979;140(5):758-64. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/140.5.758>
17. Ummoh JU, Blendon DC. Immunofluorescent staining of rabies virus antigen in formalin-fixed tissue after treatment with trypsin. *Bull WHO.* 1981;59(5):737-44.
18. Barnard BJH, Voges SF. A simple technique for the rapid diagnosis of rabies in formalin-preserved brain. *Onderstepoort J Vet Res.* 1982;49(4):193-4.
19. Warner CK, Whitfield SG, Fekadu M, Ho H. Procedures for reproducible detection of rabies virus antigen mRNA and genome in situ in formalin-fixed tissues. *J Virol Methods.* 1997;67(1):5-12. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00068-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00068-2)
20. Whitfield SG, Fekadu M, Shaddock JH, Niezgodna M, Warner CK, Messenger SL. A comparative study of the fluorescent antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens. *J Virol Methods.* 2001;95(1-2):145-51. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00304-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00304-4)
21. Meslin F-X, Kaplan MM. An overview of laboratory techniques in diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowsky H, editors. *Laboratory techniques in rabies.* 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. Chapter 2; p. 9-27.
22. Peixoto ZMP, Cunha EMS, Sacramento DRV, Souza MCAM, Silva LHQ, Germano PM et al. Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. *Braz J Microbiol.* 2000;31(1):72-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-8382200000100017>
23. Cunha EMS, Silva LHQ, Lara MCCSH, Nassar AFC, Albas A, Sodré MM et al. Bat rabies in the North-northwestern regions of São Paulo State - Brazil, 1997-2002. *Rev Saúde Públ.* 2006;40(6):1082-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102006000700017>
24. Silva MV. O uso de camundongos lactentes e a redução no período de duração da prova biológica de inoculação no diagnóstico laboratorial da raiva [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2000.
25. Xavier SM. Comparação dos métodos de inoculação intracerebral em camundongos (*Mus musculus*) e de inoculação em cultura de células BHK-21(C13) no diagnóstico da raiva [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2005.
26. Bagnaroli RA, Largui OP, Marchevsky N. Susceptibilidad de ratones lactantes y adultos al virus rabico demostrada por imunofluorescencia. *Bol Of Sanit Panam.* 1970;68(5):388-92.
27. World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals - rabies. Paris: World Organization for Animal Health; 2008 [acesso em 2 set 2013]. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/>
28. Megid J, Ito FH. Detecção do antígeno rábico através das provas de imunofluorescência e imunoperoxidase direta em camundongos experimentalmente inoculados, sacrificados em fase assintomática e agônica. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1990;27(2):3187-92.
29. Largui O, Jiménez CP. Método para acelerar la técnica de imunofluorescencia para el diagnostico de la rabia. *Bol Ofic Sanit Pan.* 1971;71(1):36-9.
30. Albas A, Zoccolaro PT, Rosa TZ, Cunha EMS. Diagnóstico laboratorial da raiva na região oeste do Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(6):493-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822005000600009>
31. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa: Canadian Council on Animal Care; 1984. Volume 2.
32. Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE et al. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2004.
33. Dawson B, Trapp RG. *Basical and clinical biostatistics.* New York: McGraw-Hill; 2001.
34. Kissling RE. The fluorescent antibody test in rabies. In: Baer GM. *The Natural history of rabies.* London: Academic Press; 1975. p. 401-15.
35. Bradley JA. Laboratory diagnosis of rabies in Western Canada (1968-1977). *Can Vet J.* 1979;20:186-90.
36. Webster WA. A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis. *Can J Vet Res.* 1987;51(3):367-9.
37. Antúnez MAR, Girón B, Monsalvez I, Morier L, Acosta G, Tejero Y et al. Comparison of a modified shell vial culture procedure with conventional mouse inoculation for rabies virus isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(2):255-6. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276108022013023>
38. Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A, Costa Filho MAF, Gomez Herrera JF. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2, Validation. Geneva: World Health Organization; 1997.
39. Martorelli LF. Diagnóstico laboratorial e diversidade genética do vírus rábico, isolado no Estado de São Paulo, 1989 a 2000 [tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.
40. Webster WA, Casey GA, Charlton KM. The mouse inoculation test in rabies diagnosis: early diagnosis in mice during the incubation period. *Can J Comp Med.* 1976;40(3):322-5.



41. Rudd RJ, Trimarchi CV. Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. *J Clin Microbiol.* 1989;27(11): 2522-8.
42. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.. Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico 2009. 2a ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; 2009 [acesso em 5 ago 2013]. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20dos%20herbivoros/manual%20tecnico%20para%20controle%20da%20raiva.pdf
43. Silva SR, Katz ISS, Mori E, Carnieli Jr P, Vieira LFP, Batista HBCR et al. Biotechnology advances: a perspective on the diagnosis and research of Rabies Vírus. *Biologicals.* 2013;41(4):217-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.04.002>
44. Chabra M, Bhardwaj M, Ichhpujani RL, Lal S. Comparative evaluation of commonly used laboratory tests for post-mortem diagnosis of rabies. *Indian J Pathol Microbiol.* 2005;48(2):190-3.
45. Cabral CC, Morais ACN, Dias AVAB, Araújo MG, Moreira WC, Mattos GLM. Circulation of the rabies virus in non-hematophagous bats in the State of Rio de Janeiro, Brazil, during 2001-2010. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(2):180-3. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000200008>
46. Robardet E, Picard-Meyer E, Andrieu S, Servat A, Cliquet F. International interlaboratory trials on rabies diagnosis: an overview of results and variation in reference diagnosis techniques (fluorescent antibody test, rabies tissue culture infection test, mouse inoculation test) and molecular biology techniques. *J Virol Methods.* 2011;177(1):15-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.06.004>
47. Chandranaik BM, Harish BR, Bamne S, Shivaraj S, Sivakumar G, Venkatesha MD et al. Comparative evaluation of seller's staining and fluorescent antibody technique for the diagnosis of rabies. *Indian Vet J.* 2010;87(8):754-6.
48. Calisher CH, Karabatsos N, Zeller H, Dogoutte J-P, Tesh RE, Shope RE, et al. Antigenic relationships among rhabdoviruses from vertebrates and haematophagous arthropods. *Intervirology.* 1989;30(5):241-57. <http://dx.doi.org/10.1159/000150100>
49. Woldehiwet Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. *Clin Chim Acta.* 2005;351(1-2):49-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cccn.2004.09.018>
50. Almeida JD, Atanasiu P, Bradley DW. Manual for rapid laboratory viral diagnosis. WHO Offset Publication. 1979;47:1-48.
51. Fooks AR, Johnson N, Freuling CM, Wakeley PR, Banyard AC, McElhinney LM et al. Emerging technologies for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21st century. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(9):e530. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000530>
52. Kadam SS, Sherikar AA, Pingale VS. Comparative analysis of routine laboratory diagnostic tests for rabies. *Indian J Virol.* 2011;22(2):142-5. <http://dx.doi.org/10.1007/s13337-011-0052-1>
53. Germano P. Comparative study of the Seller's staining method, direct immunofluorescent and mouse inoculation test for laboratory diagnosis of rabies in dogs. *Vet Bull.* 1977;47(11):6082.
54. Riddle T, Liles S, Robert G, Hayne S. Rabies diagnostic review. *Lab Manag.* 1987;25:43-45.
55. Lumlerdacha B. Laboratory techniques for rabies diagnosis in animals at QSML. *J Med Assoc Thai.* 2005;88(4):550-3.
56. Favi C M, Roos K O, Yung P V. Evaluación de la técnica de cultivos celulares frente a la inoculación en ratones lactantes en el diagnóstico de rabia. *Av Cienc Vet.* 1992;7(2):172-9.
57. Rudd R, Trimarchi C. Comparison of sensitivity BHK21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of the street strain rabies virus. *J Clin Microbiol.* 1987;25(8):1456-8.
58. Barrat J, Barrat MJ, Picard M, Aubert MFA. Diagnosis of rabies infection by cell culture. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1988;11(3-4):207-14. [http://dx.doi.org/10.1016/0147-9571\(88\)90039-2](http://dx.doi.org/10.1016/0147-9571(88)90039-2)
59. Saxena SN, Madhusudana SN, Tripathi KK, Gupta P, Ahuja S. Evaluation of the new rapid rabies immunodiagnosis technique. *Indian J Med Res.* 1989;89:445-8.
60. Rudd RJ, Trimarchi CV, Abelseth MK. Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus. *J Clin Microbiol.* 1980;12(4):590-3.
61. Tollis M, Buonavoglia C, di Trani L, Vignolo E. Sensitivity of different cell lines for rabies virus isolation. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1988;35(1-10):504-8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0450.1988.tb00524.x>
62. Zaroni R, Hörnlimann B, Wandeler AI, Kappeler A, Kipfer R, Peterhans E. Rabies tissue culture infection test as an alternative for the mouse inoculation test. *Altex.* 1990;7(1):15-23.
63. Madhusudana SN, Paul JPV, Abhilash VK, Suja MS. Rapid diagnosis of rabies in humans and animals by a dot blot enzyme immunoassay. *Int J Infect Dis.* 2004;8(6):339-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2004.02.006>
64. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica. controle, vigilância e profilaxia da raiva. Brasília: Ministério da Saúde; 2011 [acesso em 10 abr 2013]. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/programa_vigilancia_raiva_dados_parciais_11.pdf

Agradecimentos

Ao Prof. Márcio José Figueiredo, Ms. Marlon Vicente da Silva e Dr. Wlamir Corrêa de Moura pelas valiosas sugestões.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada. Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.