



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Medicina Veterinária
Câmpus de Araçatuba

HARUÊ CAROLINA FREIRE TAMURA

**Diagnóstico da Raiva: Estudo comparativo entre a
efetividade dos testes de cultivo celular e
inoculação viral em camundongos**

Araçatuba – São Paulo
2017

HARUÊ CAROLINA FREIRE TAMURA

**Diagnóstico da Raiva: Estudo comparativo entre a
efetividade dos testes de cultivo celular e
inoculação viral em camundongos**

Trabalho Científico, como parte do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, câmpus de Araçatuba, para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Marinho

**Araçatuba – São Paulo
2017**

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Tamura, Haruê Carolina Freire

T159d

Diagnóstico da raiva: estudo comparativo entre a efetividade dos testes de cultivo celular e inoculação viral em camundongos / Haruê Carolina Freire Tamura.

Araçatuba: [s.n], 2017.

21 f.

Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, 2017

Supervisor: Profa. Dra. Márcia Marinho

1. Lyssavirus. 2. Zoonoses. 3. Técnicas de Laboratório Clínico. 4. Saúde pública . I. T.

CDD 614.563

DIAGNÓSTICO DA RAIVA: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A EFETIVIDADE DOS TESTES DE CULTIVO CELULAR E INOCULAÇÃO VIRAL EM CAMUNDONGOS

Haruê Carolina Freire Tamura

RESUMO

A raiva é a doença mais temida na humanidade, datada desde a Antiguidade. É uma antropozoonose com letalidade de quase 100%. Caracteriza-se por causar encefalite em mamíferos – únicos suscetíveis ao vírus. Possui ampla distribuição mundial, apresentando-se de forma endêmica no Brasil. Os animais de produção são os mais acometidos, gerando grandes perdas econômicas no país. O diagnóstico laboratorial é imprescindível para a confirmação da doença em casos suspeitos e para o diagnóstico diferencial para as demais encefalites, além do controle e prevenção. O diagnóstico padrão ouro estipulado pela *World Health Organization* é a imunofluorescência direta e o exame confirmatório é feito pelo isolamento viral em camundongos ou em cultivo celular. Esta revisão sistemática comparou a sensibilidade do isolamento em cultivo celular com o isolamento em camundongos no diagnóstico *post-mortem* da raiva de diferentes espécies, para verificar a hipótese de que o cultivo celular é uma alternativa confiável para substituir o uso de animais. Com isso, analisou-se 12 artigos científicos retirados dos bancos de dados do PubMed, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Google Acadêmico e Science Direct. Os critérios de inclusão foram: trabalhos publicados entre os anos de 2004 e 2016, idioma inglês ou português. Os critérios de exclusão foram trabalhos que não abrangessem os métodos de diagnóstico de imunofluorescência direta, inoculação intracerebral em camundongos ou em cultivo celular. Conclui-se que é preciso padronizar a técnica de isolamento em cultivo celular para todas as espécies.

Palavras-chave: *Lyssavirus*. Zoonoses. Técnicas de Laboratório Clínico. Saúde Pública.

RABIES DIAGNOSIS: A COMPARATIVE STUDY BETWEEN THE EFFECTIVENESS OF CELL CULTURE TESTS AND VIRAL INOCULATION IN MICE

Haruê Carolina Freire Tamura

SUMMARY

Rabies is the most frightening disease for humanity, since ancient times. It is an anthroozoonosis with a percentage of lethality of almost 100%. It is characterized by causing encephalitis in mammals – the only species susceptible to the virus. It has a wide distribution around the world, presenting itself endemic in Brazil. Farm animals are the most affected, fact that brings great economic losses to the country. Laboratory diagnosis is essential for the disease confirmation in suspect cases and for the differential diagnosis for the others encephalitis, besides the control and prevention. The gold-standard diagnosis stipulated by the World Health Organization is fluorescent antibody test and confirmatory diagnosis is done by viral isolation in mice or in cell culture. This systematic review has compared the sensitivity of isolation in cell culture to the isolation in mice in the *post-mortem* diagnosis of rabies of different species, in order to verify the hypothesis that cell culture is a reliable alternative to replace the use of animals. Therefore, 12 scientific articles extracted from data sets of the PubMed, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Scholar Google and Science Direct were analyzed. Inclusion criterias were: scientific articles published between the years of 2004 and 2016, English or Portuguese languages. Exclusion criterias were studies that did not contemplate methods of fluorescent antibody test, intracerebral inoculation in mice or in cell culture. Drawn conclusion that it is necessary to standardize the technique of isolation in cell culture for all species.

Key words: *Lyssavirus*. Zoonosis. Clinical Laboratory Techniques. Public Health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. Figura 1 – Mapa do risco humano de contrair raiva no mundo, 2013 10

LISTA DE TABELAS

- 1 Tabela 1 – Comparação entre os métodos de isolamento viral em camundongos e em cultivo celular, de acordo com a sua sensibilidade ou concordância nos estudos selecionados segundo autor e ano..... 13
- 2 Tabela 2 – Tipos de linhagens celulares utilizadas no isolamento viral em cultivo celular 14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHK-21= *Baby hamster kidney*, linhagem 21

HEK-293 = *Human embryonic kidney*, linhagem 293

IVC = Isolamento viral em camundongos

IVCC = Isolamento viral em cultivo celular

IFD = Imunofluorescência direta

MNA = *Murine neuroblastoma*, linhagem N2A

RABV = *Rabies virus*

RTCIT = *Rapid tissue culture infection test*

SNA = Sistema Nervoso Autônomo

SNC = Sistema Nervoso Central

SNP = Sistema Nervoso Periférico

WHO = *World Health Organization*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4	CONCLUSÃO	18
5	REFERÊNCIAS	19

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa aguda, de caráter zoonótico, causada pelo vírus da família *Rhabdoviridae*, do gênero *Lyssavirus*. Possui 11 genótipos distintos, sendo o *Rabies virus* (RABV) o vírus clássico da raiva, pertencente ao genótipo 1. Nesse genótipo estão incluídos os “vírus de rua” isolados de animais domésticos e silvestres de vários continentes. A doença caracteriza-se por provocar encefalomielite aguda fatal em mamíferos e humanos, sendo transmitida principalmente por morcegos e animais carnívoros, incluindo-se cães e gatos domésticos e outras espécies de animais silvestres, estes denominados reservatórios ou animais amplificadores (ITO; MEGID, 2016).

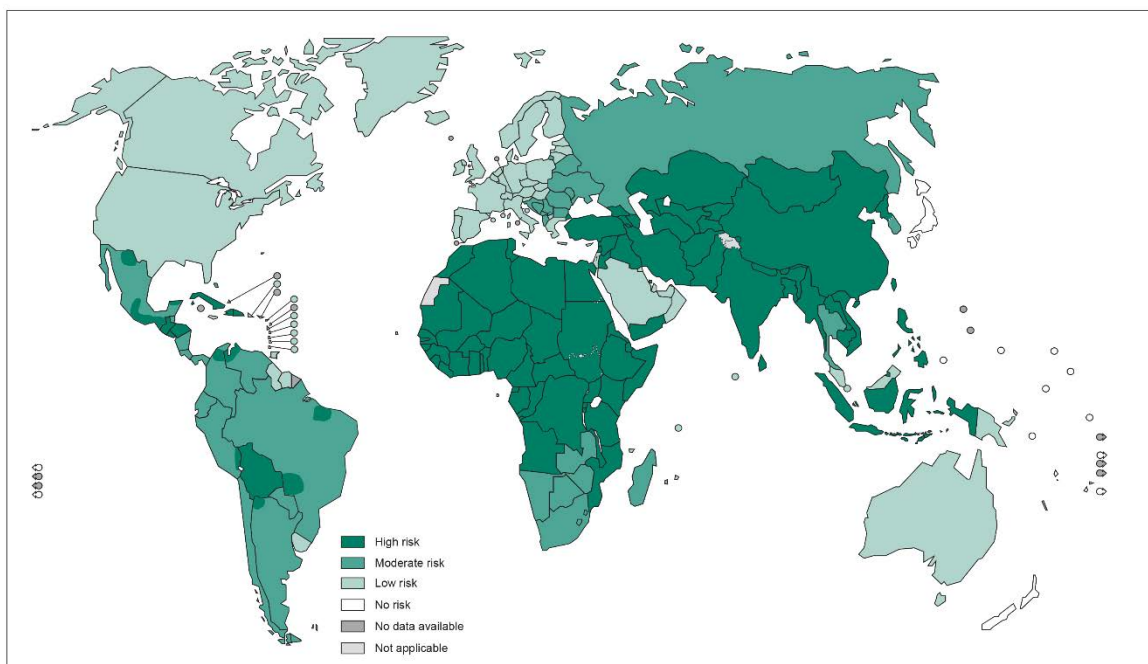
O vírus possui alta capacidade de adaptação às diferentes espécies de mamíferos, apresentando ampla distribuição mundial. A cadeia epidemiológica da raiva está dividida em 4 ciclos: urbano, rural, silvestre terrestre e silvestre aéreo - sendo o ser humano hospedeiro final e vulnerável em todos os ciclos (KOTAIT, 2010). A maioria das infecções pelo vírus rábico ocorre por transmissão percutânea através da mordedura de animais infectados (HIPÓLITO, 1948). A transmissão por via aérea, pela inalação de aerossóis, ocorre raramente. O contato com ferimentos abertos e membranas mucosas podem ocasionalmente levar à transmissão de raiva, assim como transplantes de órgãos (BATISTA et al., 2007). O vírus invade o organismo, replica-se localmente no ponto de inoculação até atingir concentração suficiente para alcançar terminações nervosas. O vírus rábico atinge o Sistema Nervoso Periférico (SNP) movendo-se em direção ao Sistema Nervoso Central (SNC), seguindo um trajeto centrípeto. A partir da intensa replicação no SNC, o vírus segue em direção centrífuga, disseminando-se através do SNP e Sistema Nervoso Autônomo (SNA) para vários órgãos e glândulas salivares – sendo eliminado pela saliva dos seres infectados (BRASIL, 2014).

Os sinais clínicos da doença podem ser divididos em três fases: prodrômica, furiosa e parálitica. Porém, muitas vezes, estas fases podem não ser distinguidas, uma vez que as fases iniciais nem sempre são evidentes. No estágio prodrômico, nota-se a mudança de comportamento em animais domésticos e a perda do instinto natural em animais silvestres. Em seguida, pode-se manifestar a fase furiosa – comumente observada em cães; é neste estágio que aparecem os sinais clássicos da

doença: hidrofobia, aerofobia, fotofobia e agressividade. Já a fase parálitica acomete, principalmente, bovinos – onde nota-se a paralisia mandibular e salivação intensa. Em geral, a doença é caracterizada por uma disfunção progressiva do SNC – podendo ser confundida com outras infecções que causam encefalomielite ou outras manifestações neurológicas (WOLDEHIWET, 2005; BATISTA, 2007).

A *World Health Organization* (WHO) classifica a raiva entre as doenças tropicais negligenciadas por ser endêmica em todos os continentes – com exceção da Antártida. De acordo com dados da WHO, estima-se que a raiva mata em torno de 60.000 pessoas no mundo por ano. No Brasil, na última década (2007-2017), ocorreram 26 mortes humanas segundo o Ministério da Saúde. Quando considerada a Saúde Pública, a raiva é a 7ª doença infecciosa de caráter global de maior importância. Já em termos econômicos, as perdas animais diretas e indiretas na pecuária representam uma estimativa de US\$ 300 milhões de dólares na América Latina, sendo US\$ 80 milhões somente no Brasil (ITO; MEGID, 2016).

Distribution of risk levels for humans contacting rabies, worldwide, 2013



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2014. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 1 – Mapa do risco humano de contrair raiva no mundo, 2013. Fonte: *World Health Organization* (WHO), 2013

O diagnóstico padrão ouro recomendado pela WHO é a imunofluorescência direta (IFD) como teste para identificação do vírus rábico. A IFD é altamente sensível, acurada e relativamente rápida. No entanto, o isolamento do vírus por inoculação intracerebral em camundongos também é recomendado para confirmação do diagnóstico pela IFD, pois o isolamento viral em camundongo (IVC) detecta vírus em amostras com baixa concentração viral, o que pode gerar resultados falsos negativos na IFD. A técnica de IVC apresenta alta sensibilidade e demora até 30 dias para obtenção dos resultados. Além disso, o vírus rábico também pode ser cultivado em células – sendo esse método relativamente fácil, barato e com redução de tempo para obtenção dos resultados (CASTILHO et al., 2007).

A preocupação com uso e bem-estar de animais de laboratório eleva-se exponencialmente. RUSSEL E BURCH (1992) propuseram o método dos 3Rs para o uso desses animais: substituição por material não-senciente (*replacement*), redução do número de animais (*reduction*) e refinamento dos procedimentos que os envolvem, diminuindo a severidade aplicada (*refinement*). Na prova biológica da raiva, estipulou-se um número máximo de 5 camundongos por caixa; lactentes ou recém desmamados devido à maior suscetibilidade ao vírus rábico e facilidade para inoculação intracerebral. É recomendável respeitar o ciclo circadiano, fornecer água potável e ração *ad libitum*, utilizar maravalha de qualidade e manter temperatura ambiente em torno de $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ para garantir o conforto e bem-estar.

Contudo, a inoculação viral em cultivo celular (IVCC) é uma alternativa ao uso de animais no diagnóstico da raiva, seguindo o conceito de *replacement* estabelecido por RUSSEL E BURCH (1992). O objetivo deste estudo visa confirmar se o isolamento viral *in vitro* possui o mesmo grau de confiabilidade do isolamento *in vivo*, de modo que tal método possa ser substituído.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão sistemática de literatura para comparar a sensibilidade do isolamento viral em cultivo celular (IVCC) com o isolamento viral em camundongos (IVC). O propósito desta revisão foi avaliar a hipótese de que o IVCC é uma alternativa confiável para substituir IVC. As informações foram obtidas pela seleção de artigos científicos e dissertações, pesquisados nos bancos de dados do PubMed, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Google Acadêmico e Science Direct nos meses de abril a junho de 2017. Os termos utilizados na estratégia de busca no Pubmed foram feitos em duas etapas: (((("diagnosis"[Subheading] OR "diagnosis"[All Fields] OR "diagnosis"[MeSH Terms]) AND ("rabies"[MeSH Terms] OR "rabies"[All Fields])) AND ("cell culture techniques"[MeSH Terms] OR ("cell"[All Fields] AND "culture"[All Fields] AND "techniques"[All Fields]) OR "cell culture techniques"[All Fields] OR ("cell"[All Fields] AND "culture"[All Fields]) OR "cell culture"[All Fields])) AND (("mice"[MeSH Terms] OR "mice"[All Fields] OR "mouse"[All Fields]) e (("rabies"[MeSH Terms] OR "rabies"[All Fields]) AND ("diagnosis"[Subheading] OR "diagnosis"[All Fields] OR "diagnosis"[MeSH Terms])) AND (("rabies virus"[MeSH Terms] OR ("rabies"[All Fields] AND "virus"[All Fields]) OR "rabies virus"[All Fields])). Os termos utilizados no BVS foram: diagnóstico da raiva AND isolamento viral. No Google Acadêmico foram utilizados os termos: cultivo celular no diagnóstico da raiva AND métodos de inoculação viral na raiva. Por fim, os termos utilizados no Science Direct foram: *diagnosis of rabies* AND *viral isolation*.

Para seleção dos artigos foi realizada a busca avançada com os seguintes critérios: idioma inglês ou português, conteúdo integral, publicação entre os anos de 2004 e 2016 e estudos que avaliassem a sensibilidade dos métodos de IVCC e IVC, tendo a IFD como base. Com isso, foram selecionados minuciosamente 12 artigos para discussão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1 – Comparação entre os métodos de isolamento viral em camundongos e em cultivo celular, de acordo com a sua sensibilidade ou concordância nos estudos selecionados segundo autor e ano

Autor	Ano	Espécie	N amostral	Comparação entre os métodos
NOGUEIRA	2004	Quirópteros	139	75% concordância de IVC ¹ com IVCC ²
XAVIER	2005	Bovina, Canina, Equina, Felina, Ovina	28	94,44% sensibilidade IVC; 88,89% sensibilidade IVCC
CASTILHO et al.	2007	Bovina, Canídeos, Quirópteros	105	Bovino e quirópteros: 100% concordância IVC com IVCC; Canídeos: 91% concordância
CHHABRA et al.	2007	Bovídeos, Canina, Equina, Felina, Humana	33	93,93% concordância IVC com IVCC
LIMA	2008	Bovina, Equina, Humana	11	100% concordância IVC com IVCC
MADHUSUDANA et al.	2010	Bovina, Canina, Felina, Primata, Humana	120	100% concordância IVC com IVCC
ROBARDET et al.	2011	Canídeos	11	35% sensibilidade IVC; 70% sensibilidade IVCC
YANG et al.	2012	Bovina, Canídeos	110	100% sensibilidade IVCC
CENTOAMORE et al.	2015	Bovina	59	IVCC foi a técnica menos sensível entre IFD ³ e IVC
KANITZ et al.	2015	Bovina	48	100% concordância IVC com IVCC
SASIKALAVENI et al.	2015	Não especificado	5	100% sensibilidade IVCC com a técnica RTCIT ⁴
CENTOAMORE et al.	2016	Não especificado	2561	120 amostras discordantes entre IVC e IVCC

¹ IVC: Isolamento viral em camundongo

² IVCC: Isolamento viral em cultivo celular

³ IFD: Imunofluorescência direta

⁴ RTCIT: *Rapid tissue culture infection test*

Foram selecionados 12 artigos comparando os resultados das técnicas de diagnóstico *post-mortem* da raiva. As amostras foram diagnosticadas pela IFD, padrão ouro estabelecido pela WHO, e confirmadas pelo isolamento viral em camundongos e em cultivo celular. A concordância entre as duas técnicas de isolamento e a sensibilidade de cada uma estão demonstradas na Tabela 1. O tamanho amostral variou de 5 a 2561 com o uso de diversas espécies, sendo que 66,67% dos estudos utilizaram bovinos em suas pesquisas. SASIKALAVENI et al. (2015) e CENTOAMORE et al. (2016) apresentaram, respectivamente, o menor e o maior número de amostras analisadas. Por não terem especificado o tipo de amostra em seus estudos, estes tornaram-se menos confiáveis, pois cada espécie possui um material de eleição que apresenta maior intensidade de marcação antigênica, visto que o RABV não infecta todas as estruturas do SNC uniformemente.

LIMA (2008), MADHUSUDANA et al. (2010), YANG et al. (2012), KANITZ et al. (2015) e SASIKALAVENI et al. (2015) demonstraram 100% de sensibilidade no IVCC, ou seja, todas as amostras positivas na IFD tiveram os mesmos resultados no cultivo celular. Entretanto, ROBARTED et al. (2011) e CENTOAMORE et al. (2015) apresentaram as menores sensibilidades para o mesmo método. Segundo estes autores, a contaminação bacteriana de suas amostras e a falta de padronização da técnica de IVCC para herbívoros podem ter contribuído para os resultados menos sensíveis.

Tabela 2 – Tipos de linhagens celulares utilizadas na inoculação viral por cultivo celular

Autor	Linhagem celular
NOGUEIRA (2004)	MNA, McCoy
XAVIER (2005)	BHK-21
CASTILHO et al. (2007)	MNA
CHHABRA et al. (2007)	MNA
LIMA (2008)	MNA
MADHUSUDANA et al (2010)	BHK-21, HEK-293, MNA
ROBARDET et al. (2011)	BHK-21, MNA
YANG et al. (2012)	MNA
CENTOAMORE et al. (2015)	MNA
KANITZ et al. (2015)	BHK-21, MNA
SASIKALAVENI et al. (2015)	MNA
CENTOAMORE et al. (2016)	MNA

BHK-21: *Baby kidney human* (linhagem 21); HEK-293: *Human embryonic kidney* (linhagem 293); McCoy: células fibroblásticas de camundongo; MNA: *murine neuroblastoma*

Nos artigos selecionados, o IVCC foi feito a partir das linhagens celulares BHK-21, HEK-293, McCoy e MNA como evidencia a Tabela 2. As células BHK-21 provém de rim de hamster-sírio (*Mesocricetus auratus*) com um dia de vida e são do tipo fibroblasto, possuindo sensibilidade semelhante à de camundongos (*Mus musculus*) desmamados (MESLIN; KAPLAN, 1996). No entanto, essa relação é variável: XAVIER (2005) obteve sensibilidade de 88,89% em células BHK-21 e 94,44% para camundongos desmamados em 18 amostras positivas (14 bovinos, 3 equinos e 1 ovino), já para KANITZ et al. (2015), a sensibilidade foi de 100% em 32 amostras positivas de bovinos – ambos autores utilizaram 72 horas no tempo de incubação.

A linhagem HEK-293 é proveniente de células renais embrionárias humanas. MADHUSUDANA et al. (2010) compararam as linhagens de HEK-293, BHK-21 e MNA, obtendo 100% de eficácia para as linhagens HEK-293 e MNA, porém para as células BHK-21 essa taxa foi de apenas 28% de eficiência. De acordo com o mesmo autor, isso pode ser explicado pela grande quantidade de proteínas neurais e receptores muscarínicos de acetilcolina que as células HEK-293 expressam. Para YANG et al. (2012), a linhagem BHK-21 é eficaz para propagar cepas fixas de vacinas, mas não para o “vírus de rua”. XAVIER (2005) obteve sensibilidade de células BHK-21 próximo a 90%, porém camundongos lactentes obtiveram 100% de sensibilidade, sendo este teste mais confiável.

As células derivadas de neuroblastoma murino compartilham características semelhantes aos neurônios humanos e apresentaram sensibilidade superior em relação às demais linhagens celulares, podendo chegar a aproximados 98% quando comparadas com a IFD (XAVIER, 2005; CASTILHO et al., 2007). CASTILHO et al. (2007) demonstraram 100% de concordância entre as técnicas de IFD, IVC e IVCC para bovinos e morcegos. Para bovinos, fora preparado inóculos de diferentes fragmentos do SNC (incluindo um *pool* com todas as estruturas), sendo o tronco encefálico o material que mais apresentou células infectadas. Além do número amostral utilizado por CASTILHO et al. (2007) já evidenciados na Tabela 1, 11.298 amostras de SNC de morcegos foram usadas para comprovar a eficácia do IVCC. De acordo com o autor e colaboradores, o uso de todo SNC em morcegos e de todos os fragmentos de SNC de bovinos, sendo estes inoculados em conjunto ou não, contribuíram para a positividade em todos os testes.

NOGUEIRA (2004) obteve sensibilidade e especificidade de 95% com a linhagem celular McCoy (células fibroblásticas de camundongos), porém quando as amostras foram comparadas com a prova biológica a concordância de resultados foi de 75%. A resposta imune do animal pode interferir e mascarar a infecção, tornando-o assintomático. Para que haja o aparecimento dos sinais clínicos, é preciso uma carga viral maior combinada à capacidade da resposta imune do camundongo. No IVCC não há interferência da resposta imune e o vírus rábico pode ser isolado mesmo com carga viral baixa. Inóculos contendo quantidades pequenas de vírus rábico podem ser isolados com sucesso no cultivo celular, enquanto que em camundongos essa taxa de sucesso foi de 50% (KING, 1996). Além disso, CHHABRA et al. (2007) isolaram, em seu estudo, o RABV de 8 amostras de líquido cefalorraquidiano humano em cultivo celular, que possui pequenas quantidades de vírus. Essas mesmas amostras foram negativas na IFD e no IVC.

É importante notar que SASIKALAVENI et al. (2015) utilizaram em seu cultivo celular o método rápido de inoculação de células - *Rapid tissue culture infection test* (RTCIT), a partir da linhagem de MNA. As placas contendo as células foram incubadas por 48 horas. Além de reduzir consideravelmente o tempo para obtenção dos resultados, esta abordagem foi eficaz com amostras de líquido cefalorraquidiano de humanos, que possui quantidade limitada.

De acordo com CENTOAMORE (2016), a IVCC pode ser utilizada como método confirmatório da raiva, no entanto, é preciso que haja mais estudos para melhorar o desempenho quanto à reprodutibilidade e repetitividade. A WHO preconiza tempo de incubação na inoculação em cultivo celular de 96 horas e sugere incubação em curto tempo de 72 horas. Porém, amostras com pequena quantidade de vírus rábico deve, obrigatoriamente, ser incubadas por maior tempo. KANITZ et al. (2015) obtiveram sucesso com incubação de 72 horas e resultados ruins com 48 horas, enquanto que SASIKALAVENI et al. (2015) obtiveram ótimos resultados com 48h.

ROBARDET et al. (2011) selecionariam 32 laboratórios de diversos países europeus para executar os métodos diagnósticos e comparar seus resultados. Houve disparidades nas metodologias aplicadas entre os laboratórios: a densidade celular, o número de células por poço, o volume de suspensão, o período de fixação da acetona e o tempo de incubação foram variáveis – esses fatores implicaram na divergência dos resultados. Além disso, houve contaminação bacteriana de algumas amostras

para IFD, afetando significativamente os resultados para IVC e IVCC. Estado de conservação de amostra comprometido, repetidos congelamento e descongelamento, exposição a agentes químicos e biológicos reduzem a sensibilidade dos testes (CASTILHO et al., 2007).

Faz-se necessário a padronização nos métodos utilizados para IVCC quanto: a escolha de fragmento a ser utilizado em cada espécie, a procedência da linhagem celular, o tempo de incubação, o volume de suspensão de vírus a ser utilizado, tempo de fixação da acetona e a temperatura da estufa de incubação. Além disso, os laboratórios devem ser corretamente estruturados com profissionais aptos a realizar os métodos diagnósticos (BONES et al., 2013; ITO; MEGID, 2016). Resultados falso-negativos podem gerar um impacto alarmante, da mesma maneira que resultados falso-positivos podem levar indivíduos desnecessariamente à profilaxia pós-exposição da raiva (YANG et al., 2012).

4 CONCLUSÃO

Após análise minuciosa dos trabalhos científicos conclui-se que não foi possível comprovar a hipótese de que o isolamento viral em cultivo celular é tão eficaz quanto o isolamento em camundongos, a ponto de ser totalmente substituído. Embora o cultivo celular seja um método mais rápido, barato, de fácil manuseio e que apresenta excelentes resultados para quirópteros, ainda existem controvérsias com os protocolos instituídos. Há a necessidade de mais estudos nessa área, afim de padronizar um protocolo definitivo que abranja todas as espécies. Deve-se fazer um melhor delineamento no cultivo celular em relação à linhagem celular utilizada e tempo de incubação.

Considerando a raiva uma zoonose de alta letalidade, a utilização da prova biológica ainda faz-se necessária para o diagnóstico confirmatório, evitando que haja resultados falso-positivos e falso-negativos. Porém, deve-se garantir o conforto e bem-estar dos animais. Conclui-se que a inoculação viral em cultivo celular deve estar associada à imunofluorescência direta e a inoculação em camundongos para resultados confiáveis.

5 REFERÊNCIAS

BATISTA, H.B.C.R; FRANCO, A.C; ROEHE, P.M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.2, n.35, p.125-144, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Raiva – informações técnicas. 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/752-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/raiva/11428-informacoes-tecnicas>>. Acesso em abril de 2017.

BONES, V.C; MOLENTO, C.F.M. Alternativas ao uso de animais de laboratório no Brasil. **Veterinária em Foco**, Canoas, v. 10, n. 1, p.103-112, 2012.

BONES, V.C; WEARY, D.M; MOLENTO, C.F.M. As barreiras à substituição do uso de animais para o diagnóstico da Raiva no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v.11, n.1, p.57, 2013.

CASTILHO, J.G et al. Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A). **Boletim Epidemiológico Paulista**. São Paulo, p. 12-18. 2007.

CENTOAMORE, N.H.F et al. Análise crítica do desempenho do isolamento viral em células como método substitutivo ao isolamento viral em camundongos no diagnóstico da raiva. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 4, n. 1, p.45-81, 2016.

CENTOAMORE, N.H.F et al. Projeto em andamento: Neuroinvasividade e neurovirulência do vírus da Raiva em amostras do Sistema Nervoso Central de bovinos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 14, n. 1, p.77-79, 2015.

CHHABRA, M et al. Development and evaluation of an *in vitro* isolation of street rabies virus in mouse neuroblastoma cells as compared to conventional tests used for

diagnosis of rabies. **Indian Journal of Medical Microbiology**, New Delhi, v. 25, n. 3, p.263-266, 2007.

HIPÓLITO, O. Raiva. In: **Doenças dos animais transmissíveis ao homem**. Serviço de Informação Agrícola, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, p.31-37, 1948.

ITO, F.H; MEGID, J. Raiva. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. **Doenças Infeciosas em Animais de Produção e Companhia**. 1.ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. Cap. 75, p. 799-824.

KANITZ, F.A et al. Virus isolation in cell culture for confirmatory diagnostic of rabies in bovine specimens. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 45, n. 12, p.2193-2196, 2015.

KING, A.A. Cell culture of rabies virus. In: **Laboratory Techniques in Rabies 1996**, 4th ed. Geneva: World Health Organization, p.114-130.

KOTAIT, I; CARRIERI, M.L; TAKAOKA, N.Y. **Raiva – Aspectos Gerais e Clínica**. 2. ed. São Paulo: Instituto Pasteur, 2010.

LIMA, J.Y.O. **Diagnóstico e caracterização antigênica e molecular de amostras positivas para Raiva de diferentes espécies no Brasil**. Monografia (Especialização Programa de Aprimoramento Profissional) – Laboratório de Virologia, Instituto Pasteur, São Paulo, 2008.

MADHUSUDANA, S.N et al. Utility of human embryonic kidney cell line HEK-293 for rapid isolation of fixed and street rabies viruses: comparison with Neuro-2a and BHK-21 cell lines. **International Journal of Infectious Diseases**. India, p. 1067-1071. 2010.

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

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

ROBARDET, E. et al. International interlaboratory trials on rabies diagnosis an overview of results and variation in reference diagnosis techniques (fluorescent antibody test, rabies tissue culture infection test, mouse inoculation test) and molecular biology techniques. **Journal of Virological Methods**, Malzéville, v.177 p.15-25, 2011.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. London: Hiperion Books, 1992.

SASIKALAVENI, A et al. Co-culture: A quick approach for isolation of street rabies virus in murine neuroblastoma cells. **Veterinary World**, India, v.8, n.5, p.636-639, 2015.

WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. **Clinica Chimica Acta**. Liverpool, v.351, n.2, p.49-63, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Rabies. Geneva: WHO, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/rabies/en/>>. Acesso em: abril 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Distribution of risks level for humans contacting rabies, worldwide, 2013. Geneva: WHO, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/rabies/Global_distribution_risk_humans_contracting_rabies_2013.png>. Acesso em: abril 2017.

XAVIER, S.M. **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 (Mestrado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

YANG, D-K et al. Comparison of four diagnostic methods for detecting rabies viruses circulating in Korea. **Journal of Veterinary Science**. Seoul, v.13, n.1, p. 43-48, 2012.