



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS  
Mestrado em Análises Clínicas Profissional

**IMPLANTAÇÃO E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DA TÉCNICA DE  
ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA (RABV) EM CÉLULAS DE  
NEUROBLASTOMA MURINO (N2A) NO PARÁ, BRASIL**

**FRANCISCO AMILTON DOS SANTOS PAIVA**

Belém-PA  
2020

**FRANCISCO AMILTON DOS SANTOS PAIVA.**

**IMPLANTAÇÃO E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DA TÉCNICA DE  
ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA (RABV) EM CÉLULAS DE  
NEUROBLASTOMA MURINO (N2A) NO PARÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb

Co-Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Taciana Fernandes Souza  
Barbosa Coelho

Belém- Pará  
2020

**FRANCISCO AMILTON DOS SANTOS PAIVA.**

**IMPLANTAÇÃO E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DA TÉCNICA DE ISOLAMENTO  
DO VÍRUS DA RAIVA (RABV) EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA MURINO  
(N2A) NO PARÁ, BRASIL**

**Data de Aprovação:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Orientador:**

---

Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb – UFRA – Orientador

---

Profa. Dra. Taciana Fernandes Souza Barbosa Coelho - Instituto Evandro Chagas  
Co-Orientador(a):

**Banca Examinadora:**

---

Profa. Dra. Eliana Vieira Pinto da Silva – Instituto Evandro Chagas

---

Profa. Dra. Elizabeth Salbé Travassos da Rosa – Pesquisadora Aposentada

---

Profa. Dra. Livia Medeiros Neves Casseb – Instituto Evandro Chagas

---

Prof. Dr. René Ribeiro da Silva – MacPro/UFPA (Suplente)

Belém- Pará  
2020

## EPÍGRAFE

“Sonho que se sonha só  
É só um sonho que se sonha só  
Mas sonho que se sonha junto é realidade”.  
Raul Seixas (1945-1989)

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais com amor e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, e por ter me possibilitado concretizar mais esse projeto que há tanto tempo almejava.

Aos meus amados e saudosos pais, Osvaldo Gomes de Paiva e Maria dos Santos Paiva (*in memoriam*) pelo exemplo de vida.

À minha esposa Maria Enisandra Araújo de Lima pelo amor e carinho.

À minha filha Alêssa Vitória Lima de Paiva pelo amor e a certeza de continuar na busca pela obtenção de conhecimentos.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb, por todo o apoio e orientação acadêmica profissional.

À minha Co-orientadora e amiga Profa. Dra. Taciana Fernandes Souza Barbosa Coelho, pelo incentivo e pelo tempo dedicado a minha formação acadêmica e profissional.

À minha amiga Dra. Livia Medeiros Neves Casseb pelo apoio, incentivo e no repasse de conhecimentos.

À amiga Dra. Elizabeth Salbé Travassos da Rosa por me convidar a fazer parte do Laboratório de diagnóstico de raiva na seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas.

Ao ex-colega de trabalho no Laboratório de raiva M.e Armando de Souza Pereira pelos conhecimentos repassados.

À Dra. Eliana Vieira Pinto da Silva do Laboratório de Cultivo Celular pela amizade e ajuda ímpar com o manuseio de células.

Ao Instituto Evandro Chagas e a Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas pelo suporte para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA) pela gentil doação das células N2A originárias da ATCC/USA, as quais foram de fundamental importância para a realização deste trabalho.

A todos meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS E QUADROS</b>	9	
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	10	
<b>RESUMO</b>	12	
<b>ABSTRACT</b>	13	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
1.1	RAIVA: CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	18
3.1	BREVE HISTÓRICO	18
3.2	TAXONOMIA	19
3.2.1	<i>Ordem Mononegavirales</i>	19
3.2.2	<i>Família Rhabdoviridae</i>	19
3.2.3	<i>Gênero Lyssavirus</i>	20
3.2.4	<b>Morfologia do RABV</b>	23
3.3	EPIDEMIOLOGIA	24
3.3.1	<b>Situação da raiva no Brasil</b>	26
3.3.2	<b>Transmissão da raiva</b>	27
3.3.3	<b>Ciclos de transmissão</b>	28
3.3.3.1	Ciclo Urbano	28
3.3.3.2	Ciclo Silvestre	29
3.3.3.3	Ciclo Aéreo	29
3.3.3.4	Ciclo Rural	29
3.4	DIAGNÓSTICO	30
3.4.1.	<b>Diagnóstico Clínico</b>	30
3.4.2	<b>Diagnóstico Laboratorial</b>	30
3.4.3.	<b>Diagnóstico Ante-mortem</b>	31
3.4.4	<b>Diagnóstico Post-mortem</b>	32
3.5	TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)	34
3.6	TÉCNICA DE ISOLAMENTO VIRAL EM CAMUNDONGO (IVC) OU PROVA BIOLÓGICA (PB)	34
3.7	TÉCNICA DE ISOLAMENTO VIRAL EM CULTURA DE CÉLULAS (IVCC)	34
3.8	BIOÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL NA APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE INOCULAÇÃO VIRAL EM CAMUNDONGO (IVC)	35
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	36
4.1	ASPECTOS LEGAIS DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA	36
4.2	AMOSTRAS	37
4.3	IMUNOFLUORESCENCIA DIRETA (IFD)	38
4.4	ISOLAMENTO VIRAL EM CAMUNDONGO (IVC) OU PROVA BIOLÓGICA (PB)	39

4.5	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR (IVCC)	42
4.5.1	<b>Descongelamento celular</b>	42
4.5.2	<b>Manutenção das células</b>	42
4.5.3	<b>Titulação do Conjugado</b>	43
4.5.4	<b>Isolamento Viral em Cultivo Celular (IVCC)</b>	44
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
5	RESULTADOS	46
5.1	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	46
5.2	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	47
5.3	COMPARAÇÃO DO TEMPO ENTRE AS TÉCNICAS DE IFD, IVCC E IVC.	47
5.4	USO DE ANIMAIS NA TÉCNICA DE IVC.	48
6	<b>DISCUSSÃO</b>	51
7	<b>CONCLUSÃO</b>	54
8	<b>REFERÊNCIAS</b>	55

**ANEXOS  
APÊNDICES**



## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1 – A Ilustração esquemática da partícula do RABV mostrando as formas estruturais; B: Tomograma de Crioeltron do RABV.	23
Figura 2 - Representação da organização genômica do RABV.	24
Figura ,3 - Representação da distribuição da raiva humana transmitida por cães com base nos dados mais recentes de diferentes fontes, no período de 2010 a 2014.	25
Figura 4 - Demonstrativa da taxa de mortalidade da raiva humana, por tipo de animal agressor (1986 – 2018).	27
Figura 5 - Figura representativa dos ciclos de transmissão do RABV.	28
Figura 6- Esquema da técnica de IFD. (A) Antígenos ligados ao anticorpo marcado e impressão de cérebro em antígenos livres. (B) Anticorpos livres e posterior ligação dos mesmos aos antígenos da impressão de tecido nervoso.	39
Figura 7 - Local anatômico do camundongo mais adequado para realizar a inoculação intracerebral	40
Figura 8- Camundongos inoculados com amostras positivas para raiva. Camundongo (A) apresentando paralisia e camundongo (B) apresentando aerofobia	41
Figura 9 - Esquema ilustrativo da realização da titulação do conjugado, considerando as diluições a partir da diluição 1:5.	43
Figura 10 - Taxa de repetições entre as três técnicas; IFD, IVCC e IVC.	48
Quadro 1 – Demonstrativo dos Gêneros da Espécie Lyssavírus.	21
Quadro 2 – Técnicas utilizadas no diagnóstico da raiva.	33
Quadro 3 - Total de amostras por espécie animal nas três técnicas de diagnóstico: IFD, IVC e IVCC.	37
Quadro 4 - Amostras testadas segundo espécie e resultado de IFD, IVC e IVCC.	46
Quadro 5 - Avaliação do Bem-estar animal em camundongos usados na técnica de IVC.	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3Rs - Reduction, Refinement e Replacement; (Redução, Refinamento e Substituição)  
a.C. – Antes de Cristo;  
ABLV - *Australian bat lyssavirus*;  
AcN - Anticorpos Neutralizantes;  
AgV - Variantes Antigênicas;  
ARAV - *Aravan lyssavirus*;  
ATCC - *American Type Culture Collection*;  
Avg3 - Variante Antigênica AgV3 de RABV;  
BBLV - *Bokeloh bat lyssavirus*;  
CDC - Centers for Disease Control and Prevention;  
CEME - Central de Medicamentos;  
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais;  
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal ()  
dRIT - Imuno-histoquímica direta;  
DUVV - *Duvenhage lyssavirus*;  
EBLV-1 - *European bat 1 lyssavirus*;  
EBLV-2 *European bat 2 lyssavirus*  
G - Glicoproteína  
GABA - Ácido Gama Aminobutírico;  
GBLV - *Gannoruwa bat lyssavirus*;  
ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses; (Comitê Internacional de Taxonomia Viral);  
IEC - Instituto Evandro Chagas  
IFD - Imunofluorescência Direta;  
IKOV - *Ikoma lyssavirus*;  
IRKV - *Irkut lyssavirus*;  
IVC - Isolamento Viral em Camundongos;  
IVCC - Isolamento Viral Cultivo de Células  
KHUV - *Khujand lyssavirus*;  
LANAGRO – Laboratório Agropecuário do Pará  
L - RNA-polimerase  
LBV - *Lagos bat lyssavirus*;  
LCR - Líquido Cefalorraquidiano;  
LLEBV - *Lleida bat lyssavirus*;  
M - Proteína Matriz;  
MEM - Meio Mínimo Essencial;  
MOKV - *Mokola lyssavirus*;  
N - Nucleoproteína;  
N2A- Linhagem de Células de Neuroblastoma Murino;  
NB2 - Laboratório de Nível de Segurança Biológica 2;  
NC - Nucleocapsideo;

nt – Nucleotídeos;  
OIE - World Organization For Animal Health; (Organização Mundial da Saúde Animal)  
OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde;  
P - Fosfoproteína;  
PB - Prova Biológica;  
PBS - Tampão Fosfato-Salino;  
pH - Potencial Hidrogeniônico  
PNPR – Programa Nacional de Profilaxia da raiva  
RABV - *Rabies lyssavirus*  
RNA - Ácido Ribonucleico  
RNPs - ribonucleoproteínas  
RT-PCR- Reação em cadeia mediada pela Polimerase precedida de transcrição reversa  
SHIBV - *Shimoni bat lyssavirus*  
SNC - Sistema Nervoso Central  
ssRNA - RNA de fita simples  
TBLV - *Taiwan bat lyssavirus*  
WCBV - *West Caucasian bat lyssavirus*  
WHO - World Health Organization; (Organização Mundial da Saúde)

## RESUMO

A raiva é uma doença infecciosa que atinge todos os animais de sangue quente e é causada pelo *Rabies lyssavirus* (RABV), um rbdovírus neurotrópico, que desencadeia processos patológicos como encefalomielite aguda, sendo este fator diretamente relacionado a alta letalidade da doença. Diante da gravidade da infecção causada pelo RABV, apenas o diagnóstico laboratorial pode fornecer um resultado definitivo, além de ser necessário para o conhecimento da circulação do vírus na região e conseqüentemente para a adoção de medidas específicas de vigilância epidemiológica e de controle. O teste considerado padrão ouro, para o diagnóstico da raiva é a Imunofluorescência Direta (IFD), entretanto este pode gerar resultados falsos negativos se fazendo necessário a confirmação do resultado utilizando o Isolamento Viral em Camundongo (IVC). Porém, em virtude do uso de animais estar sendo bastante questionado a IVC, vem sendo substituída pelo Isolamento Viral em Cultivo Celular (IVCC), que se mostra também uma técnica altamente sensível e específica para o RABV, agregado à celeridade e a não utilização de animais, Neste sentido, o objetivo deste estudo foi comparar as técnicas de IVC e IVCC, e IFD quanto ao tempo de execução, espaço físico, custo dentre outros fatores, no laboratório de diagnóstico de raiva do Instituto Evandro Chagas (IEC), referência para a região Norte. Para a realização deste trabalho, foram utilizadas 215 amostras de diferentes espécies de animais, que foram encaminhadas por demanda passiva pelas Unidades das Secretarias de Saúde e Agências de Defesa Agropecuária dos estados brasileiros da região amazônica. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a técnica de IVCC, mostrou ótima sensibilidade e especificidade em relação à técnica de IVC, porém demonstrou ser superior, pois apresentou um período de tempo mais curto para o diagnóstico da raiva, além de não utilizar animais, contribuindo com os princípios da bioética e do bem-estar animal. Desta forma a técnica de IVCC encontra-se devidamente implantada e com condições de ser utilizada na rotina laboratorial do diagnóstico da raiva do IEC. Ressalta-se que com este estudo foram gerados documentos de Procedimentos Operacionais Padrão (POP) da técnica de IVCC segundo as normas estabelecidas pela Coordenação da Gestão da Qualidade do IEC.

**Palavras Chave:** Raiva. Diagnóstico. Cultivo Celular.

## ABSTRACT

Rabies is an infectious disease that affects all warm-blooded animals and is caused by *Rabies lyssavirus* (RABV), a neurotropic rhabdovirus, which triggers pathological processes such as acute encephalomyelitis, which is directly related to the high disease lethality. Given the severity of the RABV infection, only the laboratory diagnosis can provide a definitive result, besides allowing the virus' characterization circulating in a specific region, important for the adoption of specific measures of epidemiological surveillance and control. The direct immunofluorescence (IFD) is considered the gold standard for rabies' diagnosis, however, despite this, it can generate false negative results. Therefore, the confirmation by virus isolation in mice (VIM) is needed, however, due to ethical issues related to animal use, this method is being replaced by virus isolation using cell culture (VICC), that also has proven to be a highly sensitive and specific technique for RABV investigation. Moreover, it is a faster and easier to perform, and demands a less complex infrastructure. Here, we aimed to compare the VICC, VIM and IFD methods considering the time of performance, infrastructure, cost among other factors, in the Laboratory for the Diagnosis of Rabies at the Evandro Chagas Institute (IEC), a macro-regional laboratory for the North region of Brazil. Convenience samples (n=215) from different animal species received from State Health Secretariats and from the Brazilian Agricultural Defense Agencies from the Amazon region were analyzed. The results obtained in this study indicate that the VICC technique was highly sensitive and specific when compared to VIM and proved to be more useful, as it was faster and easier to perform. Furthermore, the IVCC technique is now standardized, currently available and in use in the Laboratory for the Diagnosis of Rabies, IEC and regulated by a Standard Operating Procedures (SOP).

Keywords: Rabies, Diagnosis, Cell Culture

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. RAIVA: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A raiva é uma doença infecciosa aguda causada por um vírus que compromete o sistema nervoso central (SNC), tendo como transmissores e hospedeiros susceptíveis os mamíferos. O vírus da raiva (RABV) é um rbdovírus neurotrópico, que causa uma encefalomielite, esta decorrente da sua replicação viral nos neurônios. Sendo este o fator geralmente relacionado aos óbitos causados pela doença (Barbosa et al., 2007).

Na natureza, o RABV é mantido por ciclos que estão inter-relacionados, e que envolvem diferentes espécies de animais. Didaticamente são denominados em: urbano, silvestre terrestre, silvestre aéreo e rural. O ciclo urbano é mantido por espécies domésticas, entre elas os cães e os gatos. O ciclo silvestre terrestre está relacionado à manutenção do vírus por animais silvestres como gambás, guaxinins, raposa, coiotes, chacal, jaritaca, macacos e outros. O ciclo silvestre aéreo é principalmente relacionado a manutenção do RABV na natureza por quirópteros em geral. O ciclo rural envolve a transmissão da raiva em animais herbívoros, ou de produção predominantemente, bovinos e equinos, tendo morcegos hematófagos como o principal transmissor (Escobar et al., 2015).

O RABV pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*, tendo morfologia semelhante à de um projétil. Consiste em uma partícula envelopada que possui como material genético uma fita simples de RNA de senso negativo não segmentado. O RABV possui cinco genes, que estão relacionados com a produção das estruturas virais, mais especificamente as cinco proteínas virais importantes para o seu funcionamento e organização. Tais genes estão dispostos no genoma viral na ordem apresentada no sentido 3' → 5', codificando as seguintes proteínas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína da matriz (M), glicoproteína (G) e RNA-polimerase (L); (Barbosa et al., 2007).

O gênero *Lyssavirus* atualmente apresenta 16 genótipos, ora denominados espécies pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)). A Organização Mundial de Saúde (WHO) considera como raiva apenas a doença causada pela espécie *Rabies lyssavirus* classificando as demais como “encefalites relacionadas” ou “aparentados” aos vírus pertencentes às outras espécies (Santos, 2016).

Mesmo com os mamíferos desempenhando um papel fundamental na manutenção e transmissão desta doença, em 2015 na Índia, foi descrito um caso de raiva, em uma galinha doméstica. O que alerta para a adaptação desse vírus em outras espécies, em áreas consideradas altamente endêmicas (Baby et al., 2015).

A principal porta de entrada do RABV no organismo hospedeiro é através da inoculação do vírus presente na saliva de animais infectados, via mordedura, arranhadura e/ou lambadura de mucosas ou de pele lesionada, embora outras vias sejam relatadas, como aerossóis e transplante de órgãos (Basavaraju et al., 2014).

As formas mais comuns de apresentação da doença são três como segue: parálitica, furiosa e muda ou atípica. Sendo a primeira caracterizada por um quadro de paralisia ascendente. Em sua forma furiosa, observa-se hiperexcitabilidade, agressividade e espasmos musculares laringofaríngeos, a forma muda ou atípica é a fase que frequentemente passa despercebida, podendo ocorrer apenas sinais de alteração comportamental (Lima e Gagliani, 2014; Soares et al., 2017).

A raiva é uma doença de distribuição mundial, sendo considerada uma enfermidade de cunho endêmico no Brasil, com grandes variações entre as regiões (Brasil, 2017). Acredita-se que a dificuldade em controlar a raiva no país, ocorra pela circulação do vírus no ciclo silvestre, seja aéreo ou terrestre. Além de sua expansão ser influenciada por certas intervenções e/ou modificações ambientais, como também pela falta de informação da população sobre este agravo (Ferrer et al. 2014). Somatizando as precárias condições de trabalho e moradia, o difícil acesso à profilaxia, dentre outros. Todos esses fatores devem ser considerados ao se estudar a epidemiologia social da raiva, no intuito de delinear estratégias preventivas. (Costa, 2016)

No Brasil, a incidência da infecção pelo RABV ocasiona altos custos financeiros aos sistemas de saúde, na tentativa de dar assistência à população exposta em áreas de risco e também para tratar os casos suspeitos. No âmbito da agropecuária, os animais de produção são os mais atingidos, estima-se que a raiva dos herbívoros cause prejuízos anuais de 30 milhões de dólares provocadas pela morte de milhares de cabeças, além dos gastos indiretos como a vacinação de milhões de bovinos, e inúmeros tratamentos pós-exposição (sorovacinação) de pessoas que mantiveram contato com animais suspeitos, somente na América Latina (Teixeira et al ., 2015).

Ainda que seja uma doença de extrema gravidade, a raiva é passível de controle e/ou eliminação quando se refere ao ciclo urbano, visto que está relacionado às diversas medidas

educativas e de prevenção em saúde. Isto pode se dar, por meio de campanhas de vacinação em massa de cães e gatos, e também com medidas de profilaxia pré e pós-exposição de pessoas expostas ao vírus (Silva et al., 2016).

A raiva ainda é considerada um sério problema de saúde pública e como tal, a aplicação do diagnóstico é necessária para o conhecimento do risco da doença em determinada região, e para a adoção de medidas específicas de controle. Para tal a utilização de diversas técnicas de análises laboratoriais, se tornam extremamente importantes, visando um diagnóstico célere e seguro, bem como auxiliar nos estudos que objetivam definir um perfil da doença em determinada região (Brasil, 2017).

Para o diagnóstico da raiva, os testes preconizados pela Organização Mundial de Saúde (WHO) são as técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em camundongos (IVC), ou Prova Biológica (PB), isolamento viral em cultura de células (IVCC) e diagnóstico molecular (Brasil, 2008).

Com a implantação da técnica de IVCC no laboratório de diagnóstico de raiva do IEC logra-se: contribuir para a manutenção da vida animal, diminuição de gastos, rapidez e a melhora no diagnóstico do RABV, além de ser o principal método alternativo recomendado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), ao uso de animais. Bem como, auxiliar pesquisas em andamento, como também na rotina laboratorial, uma vez que o resultado é consideravelmente mais rápido, e tão eficiente e sensível, quanto a IVC, além de ter um baixo custo, quando se fala em manter um biotério para a realização da IVC.

Com esta ferramenta implantada, padronizada e devidamente avaliada, espera-se, enriquecer as ferramentas de diagnóstico laboratorial, para a raiva do IEC. Ressaltando sua complementação ao diagnóstico clínico e diferencial, além de essencial para a confirmação de casos suspeitos.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Implantar a técnica de isolamento viral em cultivo celular (IVCC) para o diagnóstico da raiva, utilizando a linhagem de células de neuroblastoma murino (N2A) no laboratório de diagnóstico de raiva do IEC.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Padronizar a técnica de Isolamento Viral em Cultura de Células de neuroblastoma de camundongo, a partir do protocolo utilizado no Instituto Pasteur em São Paulo.
- b) Comparar as técnicas de Imunofluorescência Direta (IFD), Isolamento Viral em Camundongos (IVC) e a técnica de IVCC, utilizando espécimes de animais suspeitos, que forem recebidas no laboratório de raiva para análise.
- c) Avaliar o desempenho das técnicas quanto ao tempo de execução, uso de animais e os resultados obtidos na rotina laboratorial.
- d) Elaboração de documentos associados com a técnica de IVCC, como o seu Procedimento Operacional Padrão.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. BREVE HISTÓRICO

A raiva é uma das mais antigas doenças descritas, sendo conhecida desde os primórdios da civilização. Acredita-se ter sido Democritus na Mesopotâmia o primeiro a fazer uma descrição registrada de raiva, em cães, há aproximadamente 500 anos antes de Cristo (a.C.). Além disso, na mesma época, a doença era atribuída inicialmente aos deuses, sendo reconhecida como uma influência maligna (Steele e Fernandez, 1991).

A história registrada da raiva estende-se desde o século XX a.C., na forma de um decreto no código de Eshnunna da Mesopotâmia, que definia as penalidades para os donos de um cão raivoso cuja mordida resultasse na morte de alguma pessoa. Outra causa da raiva descrita na antiguidade por Plínio e Ovídio era que a enfermidade era transmitida por um verme que se alojava na língua dos cães. Por isso, naquela época se cortava o freio da língua dos cães e retirava-se o pedaço onde se pensava estar o verme, esta teoria permaneceu até Pasteur (Babboni e Modolo; 2011).

Em 1880, o cientista Francês Louis Pasteur e colaboradores iniciaram seus estudos científicos sobre a raiva. No ano seguinte, conseguiram isolar o vírus, em 1884 descreveram a atenuação da virulência da amostra após sucessivas passagens, e utilizaram experimentalmente essa vacina em animais. E finalmente em 1885 tratou com êxito um menino. O sucesso obtido com a vacina contra a Raiva foi determinante para a criação de uma instituição de pesquisa, que produzisse e aplicasse essa vacina, conseguindo apoio para a criação do “Institut Pasteur” de Paris em 1888 (Kotait et. al., 2009). Em 1903, o médico italiano Adelchi Negri descobriu, através da microscopia, inclusões intracitoplasmáticas em determinadas células do sistema nervoso central, que ficaram conhecidas por corpúsculos de Negri, e que são patognomônicas para o diagnóstico (Duarte e Drago, 2005).

No Brasil, Antonio Carini, que dirigiu o Instituto Pasteur de São Paulo, de 1906 a 1914, desempenhou papel fundamental no conhecimento sobre a doença, ao demonstrar que esta podia ser transmitida pelo morcego hematófago para animais herbívoros domésticos. A hipótese da transmissão do RABV por morcegos, posteriormente foi confirmada por Haupt e Rehaag, em Blumenau (Santa Catarina), no período de 1914 a 1916, por meio do isolamento do vírus de material nervoso do morcego *Phyllostoma superciliatum* (atualmente classificado como *Artibeus lituratus*) (Chicarino, 2009).

Em 1959, deu-se um grande avanço quando se começou a usar um teste de anticorpos fluorescentes mais sensíveis para o diagnóstico da raiva. Bem como o uso de técnicas de cultura celular para a manutenção de células infectadas com raiva, permitindo aos investigadores caracterizar o vírus e estudar a sua habilidade para infectar hospedeiros susceptíveis (Duarte e Drago, 2005).

Com a criação do Instituto Pasteur de São Paulo pelos “Barões do Café”, em 1903, e sua posterior doação ao governo do estado, em 1916, São Paulo foi o pioneiro ao implantar o Programa Estadual de Controle da Raiva em 1975. Já em 1977, com a criação do Programa Nacional de Profilaxia da Raiva, (PNPR) a partir de um convênio firmado entre os Ministérios da Saúde e da Agricultura, da Central de Medicamentos (CEME) e da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) deram início as medidas sistemáticas de vacinação antirrábica canina. Embora esse programa tenha sido instituído em 1973, apenas no ano de 1977 atingiu todos os Estados e Territórios Federais (Babboni e Modolo, 2011).

## 3.2. TAXONOMIA

### 3.2.1. Ordem *Mononegavirales*

Na ordem *Mononegavirales* estão agrupados os vírus que apresentam como característica o seu genoma formado por RNA de fita simples (ssRNA), não segmentado e polaridade negativa. Atualmente essa ordem está constituída de onze famílias: *Artoviridae*, *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Lispiviridae*, *Myonnaviridae*, *Nyamiviridae*, *Paramyxoviridae*, *Pneumoviridae*, *Rhabdoviridae* *Sunviridae* e *Xinmoviridae* (ICTV, 2019)

### 3.2.2. Família *Rhabdoviridae*

A família *Rhabdoviridae* inclui 18 gêneros e 134 espécies. Os vírus apresentam envelope e sua morfologia em forma de cilindro, mas também foram relatados vírus filamentosos, e não envelopados. A família é ecologicamente diversificada, com membros infectando plantas ou animais, incluindo mamíferos, aves, répteis ou peixes (Walker et al, 2018).

### 3.2.3. Gênero *Lyssavirus*

Basicamente o Gênero *Lyssavirus* constitui um conjunto de vírus adaptados para a replicação no sistema nervoso central (Bassuino, 2015). Até o ano de 1950, acreditava-se que o RABV, constituía a única espécie, e que era o único vírus capaz de desenvolver a doença. No entanto com as descobertas dos vírus *Lagos bat lyssavirus* (LBV) e *Mokola lyssavirus* (MOKV) na África foi demonstrada a existência de outros Rabdovírus antígenicamente relacionados com o RABV. Diante desta informação, o ICTV, a fim de abrigar a grande variedade de novos vírus “relacionados com a raiva”, estabeleceu o Gênero *Lyssavirus*, cujo nome deriva da mitologia grega “Lyssa”, a Deusa da Loucura, raiva e frenesi. Durante as últimas décadas, o aumento da vigilância levou a descoberta de novos lyssavirus. Atualmente o gênero inclui 16 espécies estabelecidas e duas aguardando a avaliação do ICTV (Rupprecht et. al., 2018).

O gênero *Lyssavirus* encontra-se dividido em três filogrupos (I, II e III), (Quadro 1) com base em propriedades antigênicas e relações filogenéticas. O filogrupo I compreende os vírus: RABV, *Rabies lyssavirus*; ABLV, *Australian bat lyssavirus*; EBLV-1, *European bat 1 lyssavirus*; EBLV-2 *European bat 2 lyssavirus*; KHUV, *Khujand lyssavirus*; ARAV, *Aravan lyssavirus*; BBLV, *Bokeloh bat lyssavirus*; IRKV, *Irkut lyssavirus*; DUVV, *Duvenhage lyssavirus*; GBLV, *Gannoruwa bat lyssavirus*, e TBLV, *Taiwan bat lyssavirus*. O filogrupo II: LBV, *Lagos bat lyssavirus*; MOKV, *Mokola lyssavirus* e SHIBV, *Shimoni bat lyssavirus*. E o filogrupo III: WCBV, *West Caucasian bat lyssavirus*; IKOV, *Ikoma lyssavirus*; LLEBV e *Lleida bat lyssavirus* (ICTV, 2019)

**Quadro 1 – Demonstrativo das Espécies do Gênero *Lyssavirus*.**

<b>Espécies</b>	<b>Sigla</b>	<b>Países de isolamento do vírus</b>	<b>Reservatórios</b>
<b>Filogrupo I</b>			
<i>Rabies lyssavirus</i>	RABV	Global	Todos os mamíferos
<i>Aravan lyssavirus</i>	ARAV	Quirguistão	Quiróptero
<i>Australian bat lyssavirus</i>	ABLV	Austrália	Quiróptero
<i>Bokeloh bat lyssavirus</i>	BBLV	França e Alemanha	Quiróptero
<i>Duvenhage lyssavirus</i>	DUVV	Quênia e África do Sul	Quiróptero
<i>European bat 1 lyssavirus</i>	EBLV-1	Bélgica, Dinamarca, França, Alemanha, Holanda, Polônia, Rússia, Eslováquia, Espanha e Ucrânia	Quiróptero
<i>European bat 2 lyssavirus</i>	EBLV-2	Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Holanda, Noruega, Suíça e Reino Unido	Quiróptero
<i>Gannoruwa bat lyssavirus</i>	GBLV	Sri Lanka	Quiróptero
<i>Irkut lyssavirus</i>	IRKV	China e Rússia	Quiróptero
<i>Khujand lyssavirus</i>	KHUV	Tadjiquistão	Quiróptero
<b>Filogrupo II</b>			
<i>Lagos bat lyssavirus</i>	LBV	República Centro Africano, Etiópia, França, Gana, Nigéria, Senegal, África do Sul e Zimbábue	Quiróptero
<i>Mokola lyssavirus</i>	MOKV	Camarões, República Centro Africano, Etiópia, Nigéria, África do Sul e Zimbábue	Roedores e animais domésticos
<i>Shimoni bat lyssavirus</i>	SHIBV	Quênia	Quiróptero
<b>Filogrupo III</b>			
<i>Ikoma lyssavirus</i>	IKOV	Tanzânia	Civeta Africano
<i>Lleida bat lyssavirus</i>	LLEBV	Espanha	Quiróptero
<i>West Caucasian bat lyssavirus</i>	WCBV	Rússia	Quiróptero

Fonte: Adaptado de (FOOKS et al., 2017).

Uma vez que todos os produtos biológicos comercialmente disponíveis para ações contra a raiva estão baseados no RABV e oferecem proteção eficaz apenas para o filogrupo I, o qual possui distribuição cosmopolita. Esta divisão também é importante do ponto de vista, “One Health”, situação que vem ganhando mais espaço dentro das discussões científicas que tratam de questões ligadas à saúde e epidemiologia. Que nada mais é que a integração entre a saúde humana, a saúde animal, o ambiente e a adoção de políticas públicas efetivas para prevenção e controle das enfermidades trabalhando nos níveis local, regional, nacional e global (Geneva, 2018; Belotto, 2019).

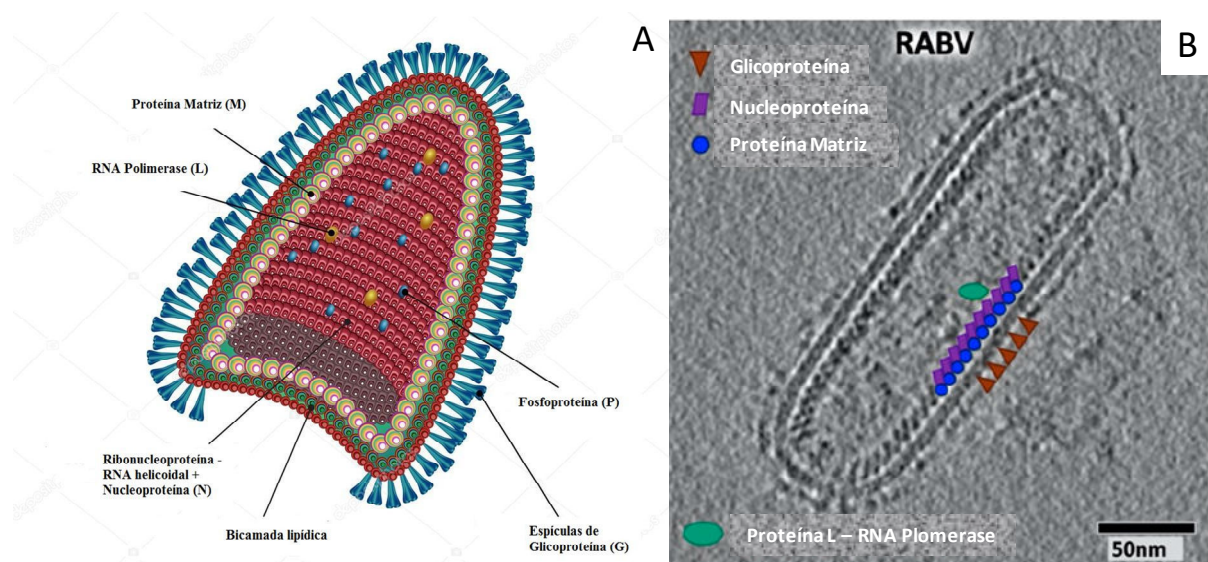
Ao longo do século XX, cientistas ligados a várias especialidades constataram similaridade nos processos infecciosos causados por doenças em seres humanos e animais. No entanto, a medicina humana e a veterinária seguiram trajetórias independentes uma da outra. Somente nos últimos anos, que se teve início a um esforço de aproximação nos estudos entre essas duas áreas (Belotto, 2019).

Com o lançamento da obra “*Veterinary Medicine and Human Health*” em 1984, o médico veterinário norte-americano Calvin W. Schwabe (1927-2006) discutiu e reforçou a importância da junção entre saúde humana, animal e ambiente. No livro, ele adota a expressão “*One Medicine*”, que mais tarde passa a ser conhecida como “*One Health*”( Belotto, 2019).

### 3.2.4. Morfologia do RABV

Morfologicamente, o RABV é semelhante à um projétil, com uma extremidade arredondada e outra plana e mede aproximadamente 130-250 nm de comprimento e 60-110 nm de diâmetro. O seu genoma consiste de uma molécula de RNA, fita simples, e não segmentado, de polaridade negativa, com o comprimento equivalente de 11,9 a 12,3 Kb (Wunner et al., 1988). As constituições das partículas se dão em: RNA (2–3%), proteína (67–74%), lipídios (20-26%) e carboidratos (3%). O RABV é constituído por dois elementos estruturais principais: um envelope de bicamada lipídica derivado da membrana citoplasmática da célula hospedeira durante o brotamento, onde estão encontradas, na superfície, espículas triméricas de Glicoproteínas (G), associada a uma segunda membrana que é formada pela proteína Matriz (M), na qual se encontra entre estas duas unidades, o Nucleocapsídeo (NC), que interage com a proteína G. O NC apresenta simetria helicoidal, possuindo 30 a 35 giros, com 50 nm de espessura por 170 nm de comprimento em média, sendo composto pelo RNA genômico, este unido às proteínas, nucleoproteína (N), RNA-polimerase (L) e fosfoproteína (P); (Figura1); (Wunner et. al., 1988; Carnieli Junior, 2009).

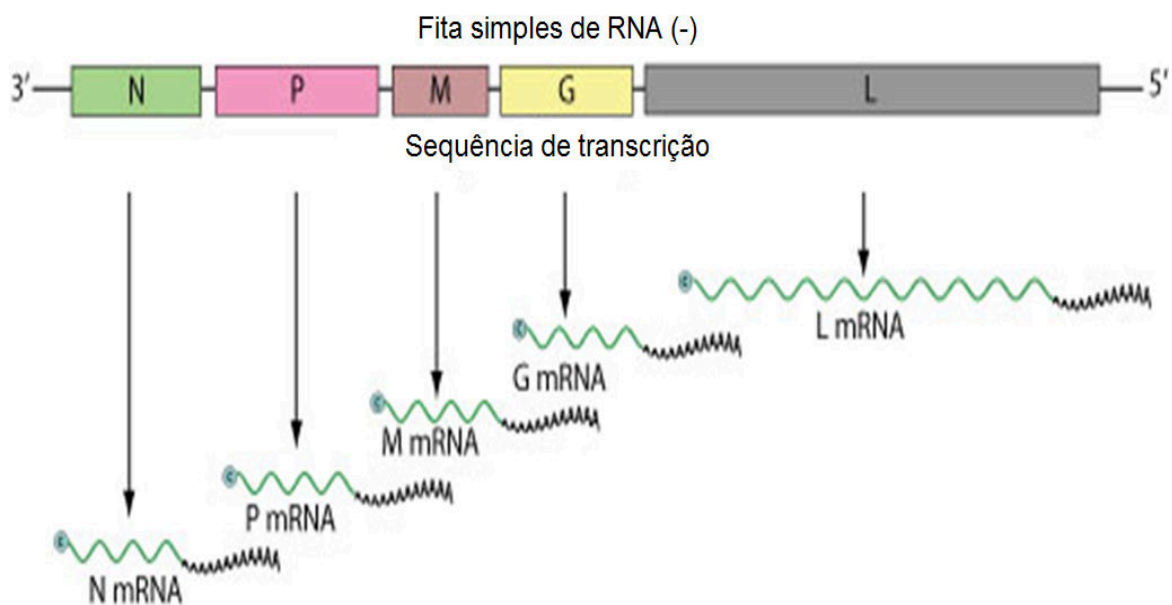
**Figura 1 – A: Ilustração esquemática da partícula do RABV mostrando as formas estruturais; B: Tomograma de Crioeletron do RABV.**



Fonte: Adaptado de A [https://www.123rf.com/photo\\_25154195\\_diagram-of-rabies-virus-particle-structure.html](https://www.123rf.com/photo_25154195_diagram-of-rabies-virus-particle-structure.html). Acesso em: 17 jun. 2020 e B: Riedel et. al.; 2020.

O genoma encontra-se organizado em uma sequência líder de 58 nucleotídeos (nt), seguida de cinco genes de proteínas estruturais; Nucleoproteína (N), Fosfoproteína (P), Proteína Matriz (M), Glicoproteína (G) e RNA-polimerase (L), na ordem 3'-N-P-M-G-L-5', separadas por regiões intergênicas não transcritas e seguidos de 57 a 70 nt trailer (Figura 2) (Kuzmin et. al., 2008).

**Figura 2 – Representação da organização genômica do RABV.**



Fonte: adaptado de (VIRALZONE, 2008).

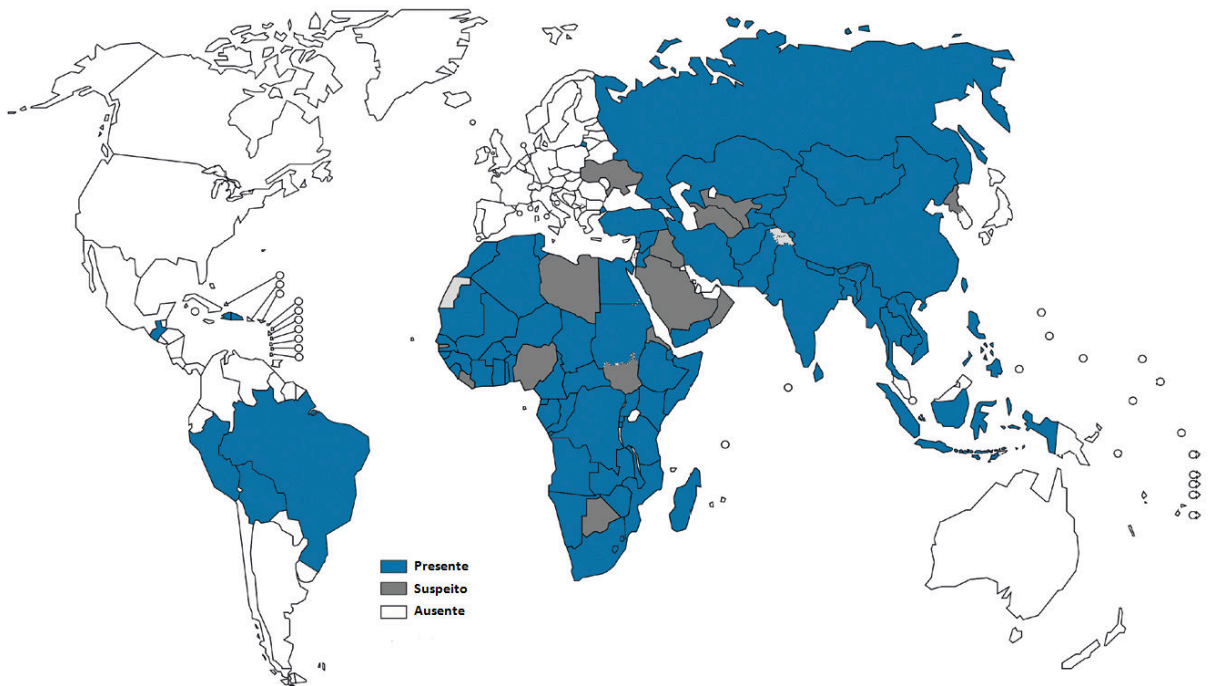
### 3.3. EPIDEMIOLOGIA

A raiva está presente em quase todos os continentes (Figura 3), exceto na Antártica, com mais de 95% das mortes humanas ocorrendo nas regiões da Ásia e África. É uma das doenças zoonóticas negligenciadas. Embora vacinas e imunoglobulinas antirrábicas humanas eficazes existam, elas não estão prontamente disponíveis ou acessíveis para aqueles que precisam. Globalmente, as mortes por raiva raramente são relatadas e as crianças com idades entre 5 e 14 anos são vítimas frequentes. Estima-se que por ano, mais de 15 milhões de pessoas em todo o mundo necessitam realizar o esquema pós-exposição, e que através de



medidas profiláticas centenas de milhares de mortes por raiva anualmente são prevenidas (Fooks et. al., 2017).

**Figura 3 – Representação da distribuição da raiva humana transmitida por cães com base nos dados mais recentes de diferentes fontes, no período de 2010 a 2014.**



Fonte: adaptado de (Geneve 2016).

No universo animal considera-se que o RABV seja responsável por centenas de milhares de casos da doença. Diante deste cenário, inovações para um maior conhecimento da raiva foram sendo, aplicados. Entre eles métodos de sequenciamento filogenético de última geração permitiram a investigação da epidemiologia e evolução do RABV, e forneceu novos conhecimentos sobre a filogeografia detalhada da doença. Por exemplo, tais estudos identificaram que a paisagem natural, como as cadeias de montanhas e os cursos de água possuem ação de barreiras naturais para a propagação da raiva. Uma vez que o homem moderno, ao construir novos acessos contribui para o deslocamento de animais, sendo este um fator facilitador para dispersão da doença (Horton, et. al., 2015).

### 3.3.1. Situação da raiva no Brasil

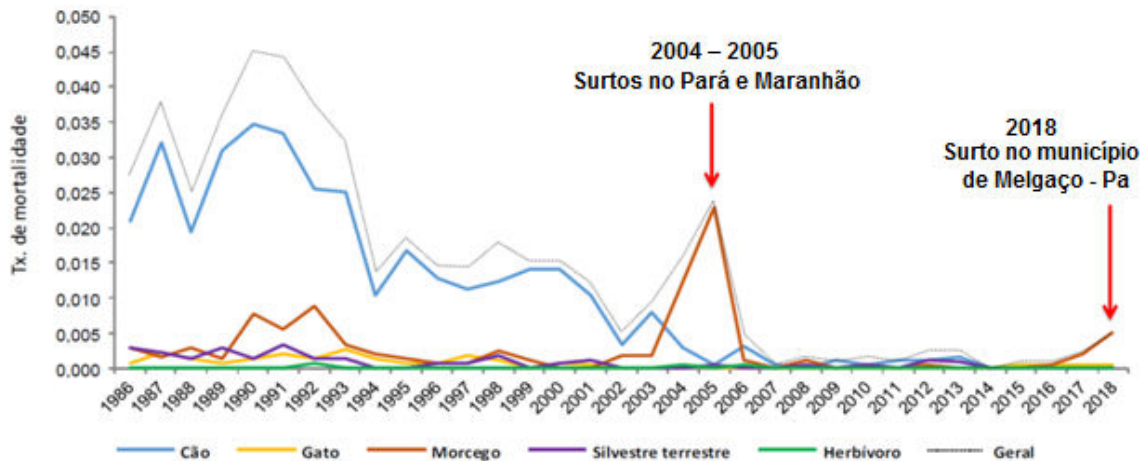
No Brasil, a raiva é endêmica, com grandes variações entre as regiões do país. Até 2005, eram registrados dezenas de casos humanos no país. A partir de 2006, o número de casos caiu para um dígito e vem se mantendo nessa faixa (Brasil, 2017). Este feito ocorreu com a intensificação das ações de vigilância e controle da raiva canina e felina, onde nos últimos 30 anos, o Brasil alcançou significativa redução nas taxas de mortalidade por raiva humana, com o predomínio de casos em caráter esporádicos e acidentais (Brasil, 2019).

O RABV apresenta sete caracterizações antigênicas (AgV) distintas no Brasil, sendo duas encontradas, principalmente, em cães *Canis familiaris* (AgV1) e (AgV2), três em morcegos, *Desmodus rotundus*; (AgV3), *Tadarida brasiliensis* (AgV4) e, *Lasiurus spp.* (AgV6) e outras duas variantes em reservatórios silvestres, que são o *Cerdocyon thous* (Cachorro do Mato) (AgV2)<sup>2</sup> e o *Callithrix jacchus* (Sagui de Tufo Branco) (AgVCN). Estas últimas não são compatíveis com o painel estabelecido pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), para estudos do RABV nas Américas (Brasil, 2016).

Nos anos de 2004 e 2005, foram relatadas as ocorrências de surtos de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos, *Desmodus rotundus* no Estado do Pará. Em 2004, nos municípios de Portel foram relatados 15 óbitos, e em Viseu com seis óbitos, Outro surto ocorreu em junho de 2005, no município de Augusto Corrêa, onde ocorreram 15 óbitos. Neste mesmo ano, foram relatados outros surtos nos municípios de Godofredo Viana, Cândido Mendes, Carutapera e Turiaçu, Estado do Maranhão, com o total de 24 óbitos humanos (Barbosa et. al., 2007).

No ano de 2018, foram registrados 11 casos de raiva humana no Brasil. Destes, dez relacionados a um surto em área ribeirinha do município de Melgaço, no Estado do Pará, onde nove eram menores de 18 anos e todos com histórico de espoliação por morcegos e sem realização de profilaxia antirrábica pós-exposição. E o décimo primeiro caso registrado, foi um homem morador do Estado do Paraná, mas que foi espoliado por morcego em Ubatuba, no Estado de São Paulo. (Brasil, 2019) (Figura 4).

**Figura 4 - Demonstrativo da taxa de mortalidade de raiva humana por tipo de animal agressor (1986 – 2018)**



Fonte: adaptado de <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva>.

### 3.3.2. Transmissão da raiva

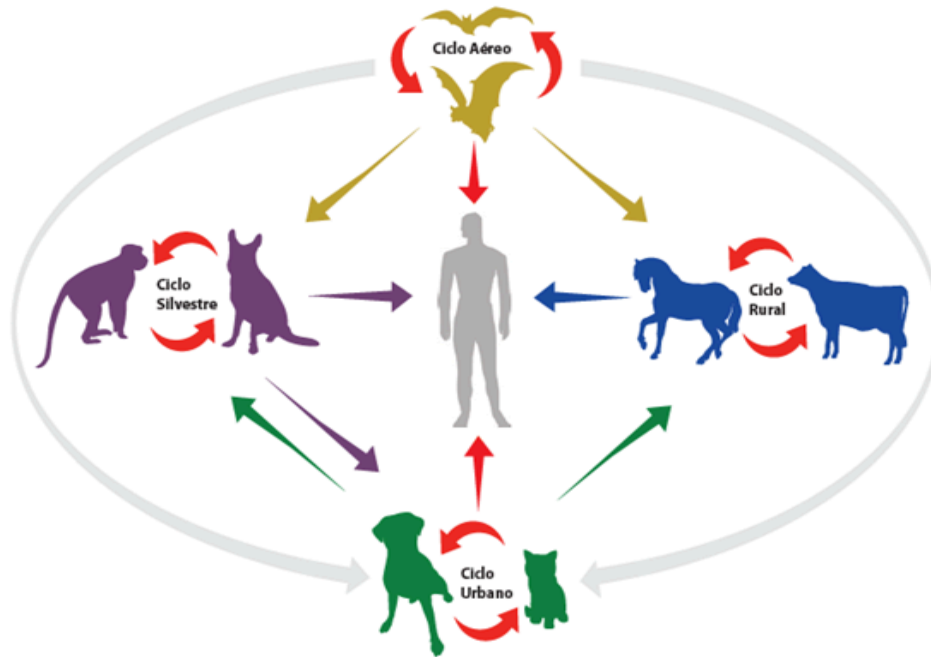
O RABV é transmitido globalmente por uma ampla gama de hospedeiros mamíferos principalmente das ordens Carnívora e Chiróptera (Marston et. al., 2018). A transmissão ocorre, através do contato com a saliva do animal infectado (mordidas, arranhões, lambeduras em pele lesionada ou mucosas). No entanto, outras formas de transmissão merecem ser mencionadas: por aerossóis (cavernas povoadas densamente por morcegos infectados, manipulação do RABV em laboratório), zoonose, transplantes de órgãos, manipulação de carcaças e/ou ingestão de carnes (Kotait et. al., 2009; Duarte e Drago, 2005).

A transmissão da raiva, na maioria das vezes, ocorre entre hospedeiros da mesma espécie, contudo, pode também ser transmitida para outros de espécies diferentes, que não são tidos como reservatórios naturais da doença esse contato interespecies é denominado de “*spillover*” e pode resultar na emergência de uma nova variante do RABV (Pereira, 2012; Kotait et al., 2018).

### 3.3.3. Ciclos de transmissão

Na natureza, o RABV é mantido por ciclos inter-relacionados e didaticamente denominados ciclo urbano, silvestre terrestre, silvestre aéreo e rural (Figura 5) (Escobar et al., 2015).

**Figura 5 – Figura representativa dos ciclos de transmissão do RABV.**



Fonte: adaptado de (Brasil 2014).

#### 3.3.3.1. Ciclo Urbano

O ciclo urbano se caracteriza principalmente pelo acometimento de espécies domésticas, sendo o cão o principal animal envolvido. A característica zoonótica desse vírus é mais alarmante em função da relação que esse animal tem com seres humanos. Outro aspecto é a vulnerabilidade do cão a outras variantes do vírus que têm outras espécies como hospedeiros naturais, como é o caso da transmissão do RABV de morcegos para cães, gerando, eventualmente, grande preocupação no que se refere ao controle dessa zoonose. Esta situação alerta para a possibilidade de reintrodução do vírus em populações caninas através de animais associados a outros ciclos de transmissão (Gonçalves et al., 2015).

### 3.3.3.2. Ciclo Silvestre

Neste ciclo, o número de espécies que podem ser reservatórios do RABV é demasiadamente maior, estando tal fator diretamente relacionado à manutenção do vírus em animais de importância silvestre, como é o caso de gambás (*Mephitis mephitis*), guaxinins (*Procyon sp.*) e saguis (*Calithrix sp.*), que são considerados como reservatórios naturais do vírus no âmbito silvestre (Batista et. al., 2007). Sendo o macaco da espécie *Callithrix jacchus*, o principal transmissor de raiva para humanos na região Nordeste do Brasil (KOTAIT et al., 2018)

### 3.3.3.3. Ciclo Aéreo

O ciclo aéreo diz respeito à transmissão e manutenção do vírus na natureza por quirópteros hematófagos ou não. Sendo, este, o ciclo mais envolvido com a veiculação em larga escala do RABV, uma vez que estes animais, apesar de pertencerem a nichos bem determinados e também possuem hábitos sinantrópicos, o que facilita sua adaptação em diferentes áreas. O que sugere isto o fator responsável pela disseminação do vírus em populações rurais e até mesmo urbanas (Schneider et. al., 2009).

Na América Latina, as principais espécies de morcegos transmissoras do RABV são hematófagas. No entanto, espécies não hematófagas já foram registradas portando o vírus, como é o caso das espécies (*Tadarida brasiliensis*, *Nyctinomops macrotis*, *Myotis nigricans*, *Artibeus lituratus* e *Molossus molossus*, entre outros) (Schneider et. al., 2009).

### 3.3.3.4. Ciclo Rural

O morcego *Desmodus rotundus* é o principal transmissor da raiva no meio rural. Esse fator pode estar diretamente ligado a seu hábito alimentar e ainda por mais três fatores: alimento fácil (inserção de gado no campo), abrigo e clima e/ou temperatura. Vale ressaltar que os herbívoros são animais estacionários, logo permanecem muitas horas disponíveis para que os morcegos realizem seu repasto sanguíneo com tranquilidade, além de seu porte grande oferecer a quantidade de sangue necessária para sua sobrevivência e manutenção da prole. Estas comodidades levam os *Desmodus* elegerem estas espécies animais como fonte principal de alimentação. O que leva à pecuária, ter relação com o grande número de casos de RABV

entre bovinos principalmente, além de ser o ciclo com maior número de casos positivos (Lima et. al., 2005; Gomes, 2004).

### 3.4 DIAGNÓSTICO

#### 3.4.1. Diagnóstico Clínico

Não existem dificuldades para estabelecer o diagnóstico, quando o quadro clínico vier acompanhado de sinais e sintomas característicos da raiva, precedido por histórico de mordedura, arranhadura ou lambadura de mucosas provocadas por animal raivoso. Essa situação ocorre em cerca de 80% dos casos. Quando a doença acomete humanos e for transmitida por morcegos hematófagos, cuja forma é predominantemente paralytica, o diagnóstico é incerto e a suspeita recai em outros agravos que podem ser confundidos com raiva humana (Brasil, 2014).

Nesses casos o diagnóstico diferencial deve ser realizado com relação a outras encefalites virais, especialmente as causadas por outros Rhabdovirus e Arbovirus. Mas também enterovirose, tétano, pasteurelose por mordedura de gato e de cão, infecção por vírus B (*Herpesvirus simiae*) por mordedura de macaco, botulismo, febre por mordida de rato (Sodóku), febre por arranhadura de gato (Linforeticulose Benigna de Inoculação) e Tularemia. Em casos de doenças não infecciosas, ha de se considerar a Síndrome de Guillain-Barré, Encefalomielite Difusa Aguda, Intoxicações, quadros psiquiátricos, e Encefalite pós-vacinal (Brasil, 2016).

#### 3.4.2. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial de raiva, seja, em animais e/ou humanos deve ser sistematicamente aplicado a qualquer caso provável ou suspeito. Durante as últimas décadas, ocorreram consideráveis aperfeiçoamentos e a validação de novas técnicas e utilização de novos espécimes clínicos, e que agora estão disponíveis para o diagnóstico. No entanto, os acessos aos testes laboratoriais permanecem limitados em várias regiões do mundo, principalmente onde a raiva canina é endêmica e onde surge a maioria dos casos positivos. Há, portanto, a necessidade de desenvolver e padronizar novas ferramentas adequadas para serem usadas em laboratórios e assegurar dados confiáveis (BRASIL, 2014).

Muito embora alguns sintomas clínicos, como hidrofobia ou aerofobia, fornecerem uma forte indicação de infecção por RABV, no entanto apenas os resultados dos testes laboratoriais podem assegurar um diagnóstico definitivo, visto que as ausências de sintomas característicos podem ocorrer na raiva paralítica ou na forma atípica (WHO, 2018).

O diagnóstico laboratorial da raiva é necessário e de extrema importância para o conhecimento do risco da doença em uma determinada região, e para a adoção de medidas específicas de vigilância epidemiológica e controle, sendo que a sua ausência acarreta na subnotificação da doença, prejudicando os dados epidemiológicos (Pedrosa et. al., 2018).

### **3.4.3. Diagnóstico Ante-mortem**

Na maioria das áreas endêmicas, os testes de diagnóstico ante-mortem não são realizados na rotina, isso se deve ao fato dos laboratórios não possuírem, instalações ou recursos necessários para o desenvolvimento dessas técnicas. A falta destes serviços pode prejudicar o atendimento adequado ao paciente, assim como alertar os serviços de vigilância para os potenciais riscos da circulação do RABV (Fooks et al., 2017).

As amostras utilizadas para o diagnóstico ante-mortem são obtidas a partir de biópsias de pele da região da nuca, (foliculo piloso) e saliva, as quais são testadas para a detecção de RNA por transcriptase reversa através de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e presença de antígeno viral (nucleoproteína), respectivamente. E atualmente uma série de ensaios derivados desta técnica, entre eles a RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) demonstram serem testes rápidos, altamente sensíveis e específicos e são cada vez mais utilizados para o diagnóstico ante-mortem da raiva (Dacheux et. al., 2008; Fooks et. al., 2009).

A urina também se constitui outra amostra biológica interessante e que deve ser usada nos testes moleculares, visto que a detecção do RABV, especialmente nos estágios iniciais da doença, continua sendo um desafio, o que também contribuiria para um aumento do número de amostras testadas, e conseqüentemente melhorar a probabilidade de identificações da presença do vírus. As amostras de impressão de córneas apresentam valor limitado e não estão sendo mais utilizadas. Outros métodos de diagnóstico, como o Isolamento Viral em Cultura de Células (IVCC), não são suficientemente sensíveis para serem aplicados no diagnóstico ante-mortem, além de exigirem recursos e instalações apropriadas para a cultura de tecidos, o que pode limitar, mas não desconsiderar sua utilização quando se tem condições de realizá-lo (WHO, 2013).

Os anticorpos neutralizantes (AcN) do RABV, surgem normalmente no soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) nos estágios finais da doença e a sua pesquisa é recomendada tanto a nível internacional como no Brasil. Ela pode ser realizada no soro de indivíduos não vacinados e LCR de indivíduos vacinados ou após vacinação, através da Técnica de Soroneutralização em Cultura Celular. Não é considerado um teste de diagnóstico, no entanto dependendo do caso deve ser utilizado (WHO, 2013).

Ressalta-se que diante de um resultado laboratorial ante-mortem positivo este é considerado conclusivo. Porém, um resultado negativo, este não deve excluir a suspeita da raiva (Wacharapluesadee e Hemachudha, 2010; Rupprecht e Plotkin, 2013).

#### **3.4.4. Diagnóstico Post-mortem**

O tecido nervoso constitui a amostra de escolha para o diagnóstico post-mortem, e o método de Imunofluorescência Direta (IFD), é o teste Padrão Ouro, sendo recomendado tanto pela World Health Organization (WHO), como pela World Organization For Animal Health (OIE), por produzir resultados confiáveis em curto espaço de tempo e ser de baixo custo principalmente em amostras frescas com menos 04 horas (OIE, 2004). Dessa forma a sensibilidade da IFD depende da qualidade das amostras, do grau de conservação e da área coletada. Sempre é recomendada a realização de mais de uma técnica diagnóstica, a fim de se considerar uma maior segurança dos resultados (Coetzer et al., 2014; WHO, 2013).

As técnicas de biologia molécula, como a RT-PCR e a qRT-PCR também são sensíveis e específicas, porém de um custo elevado e requer expertise para realização das técnicas. Diante dessas condições elas estão prontas para substituir as técnicas secundárias existentes (Quadro 2) e atualmente essas técnicas já são reconhecidas pela OIE. Entretanto, como a maioria dos métodos de diagnóstico post-mortem baseiam-se nas técnicas de IFD, IVC e IVCC o surgimento de novas ferramentas que possam gerar resultados rápidos e confiáveis, tendem a surgir, entre elas é o Teste de Imunohistoquímica Direto Rápido (dRIT) que foi criado pelo CDC nos Estados Unidos (Fooks et. al., 2017).

A técnica de dRIT, se dá através do achado da proteína viral N (nucleoproteína) em amostra cerebral fixada com uma mistura de formalina tamponada, anticorpo monoclonal concentrado, estreptavidina peroxidase e um reagente de coloração. O resultado é positivo quando aparecem aglomerados vermelho-acastanhados intraneuronais e ao longo dos axônios. A vantagem desta técnica é sua rapidez, dura em torno de 1 hora, e não há necessidade do microscópio de fluorescência, o que reduz o custo. Ao contrário, requer um microscópio



óptico simples, além de ser útil em locais que não possuem condições econômicas adequadas. A desvantagem, está na aquisição dos reagentes, os quais estão disponíveis no Center for Diseases Control (CDC), em Atlanta. A dRIT pode ser utilizada mesmo em amostras em diferentes graus de conservação. Esta técnica tem grandes possibilidades de ser adotada em larga escala, principalmente em regiões endêmicas, onde a falta de dados e o impacto da doença é desproporcionalmente elevados; (Lembo et. al.,2006).

**Quadro 2 - Técnicas mais utilizadas no diagnóstico da raiva, segundo a OMS.**

<b>Técnicas de Diagnóstico</b>	<b>Alvo pesquisado</b>	<b>Tempo de realização do teste</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Ante-mortem</b>				
<b>RT-PCR convencional</b>	RNA viral	3-4 horas	Rápido Alta sensibilidade e especificidade Riscos de contaminação reduzidos Pode ser utilizado para caracterização genética	Requer equipamento especializado
<b>RT-qPCR</b>	RNA viral	2-3 horas	Rápido Alta sensibilidade e especificidade Riscos de contaminação reduzidos	Requer equipamento especializado Não permite caracterização genética
<b>Post-mortem</b>				
<b>Imunofluorescência Direta (IFD)</b>	Antígenos rábicos	2-3 horas	Rápido Alta sensibilidade e especificidade	Requer um microscópio de luz ultravioleta Os resultados podem ser de difícil interpretação
<b>Imuno-histoquímica direta (dRIT)</b>	Antígenos rábicos	2-3 horas	Rápido Requer apenas um microscópio de luz	Os resultados podem ser de difícil interpretação
<b>Inoculação viral em cultura de células (IVCC)</b>	Vírus vivo	3 dias	Permite a caracterização antigênica	Requer instalações especializadas e profissional habilitado
<b>Inoculação viral em camundongo (IVC)</b>	Vírus vivo	Até 28 dias	Permite a caracterização antigênica	Longo tempo para o resultado Questões éticas pelo uso in vivo de animais

Fonte: adaptado de (Fooks et al., 2017)

### 3.5-TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)

O fundamento da IFD é baseado em uma prova imunológica para detectar a reação antígeno-anticorpo, em que um conjugado antirrábico específico, é utilizado e este conjugado nada mais é que o anticorpo antirrábico unido a uma substância fluorescente, o isotiocianato de fluoresceína, que funciona como sistema revelador da reação (Deam et. al.,1996).

### 3.6- TÉCNICA DE ISOLAMENTO VIRAL EM CAMUNDONGO (IVC) OU PROVA BIOLÓGICA (PB)

O isolamento do RABV, através da técnica de IVC, é um método recomendado pela OMS, para a confirmação do diagnóstico da IFD. Isto porque o IVC detecta o vírus em amostras com baixa concentração viral, que pode gerar resultados falsos negativos na técnica de IFD (Castilho et. al., 2007). Esta técnica consiste em tentar replicar a doença em camundongos albinos suíços recém-nascidos, através de inoculação intracerebral de uma suspensão de tecido nervoso suspeito. Estes animais são os de escolha para a técnica de IVC, devido à sua elevada susceptibilidade aos *lyssavirus*, além do seu pequeno tamanho corporal, permitindo o alojamento em gaiolas, logo o manejo de certa forma é facilitado (WHO, 2013; WHO, 2018).

### 3.7-TÉCNICA DE ISOLAMENTO VIRAL EM CULTURA DE CÉLULAS (IVCC)

Inicialmente, as células utilizadas para esta técnica eram as da linhagem BHK-21. Porém, elas não apresentaram a mesma sensibilidade das linhagens N2A. As células de neuroblastoma, identificadas na *American Type Culture Collection* (ATCC) como CCL 131, são utilizadas, atualmente, em muitos países para o diagnóstico da raiva. Tal linhagem celular é sensível ao vírus de rua, sem nenhum grau de adaptação. A replicação do VRAB nestas células é revelada pela técnica de IFD. O resultado do teste pode ser obtido a partir de 18 horas de incubação da mistura células + vírus (um ciclo de replicação do vírus nas células) e a leitura é realizada, geralmente, após 48 horas pós-inoculação (Brasil, 2008).

O advento do IVCC facilitou uma redução substancial do uso de animais, sendo a utilização destes, não recomendada quando outros métodos estão disponíveis. No entanto, ainda não há alternativas para o uso de animais em áreas de investigação, estudos de patogenicidade, eficácia dos agentes biológicos, preparações farmacêuticas ou mesmo a ausência de laboratórios de cultura de células (Markotter et. al., 2009).

O IVCC pode ser aplicado para o diagnóstico ante-mortem e post-mortem, utilizando fluidos biológicos, como LCR, fluido lacrimal ou saliva. No entanto, a sensibilidade do teste irá variar de acordo com a intermitência da excreção viral, nível da carga viral, número de passagens das células e o estado imunológico do paciente, quanto à presença de anticorpos RABV específicos, especialmente aqueles com atividade de neutralização, pode afetar negativamente a taxa de positividade (WHO, 2018).

### 3.8-BIOÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL NA APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE INOCULAÇÃO VIRAL EM CAMUNDONGO (IVC)

Bem-estar animal é a condição fisiológica e psicológica na qual o animal é capaz de adaptar-se ao entorno, podendo satisfazer suas necessidades básicas e desenvolver suas capacidades conforme sua natureza (CONCEA, 2016).

No código sanitário para animais terrestres, Capítulo 7.1, Artigo 7.1.2 que trata dos Princípios Orientadores para o Bem-estar Animal, estabelece que as cinco liberdades reconhecidas internacionalmente (liberdade da fome, sede e desnutrição; liberdade do medo e da angústia; liberdade do desconforto físico e térmico; liberdade da dor, lesão e doença e liberdade para expressar padrões normais de comportamento) fornecem orientações valiosas no bem-estar animal (OIE, 2019).

Na Declaração Universal dos Direitos dos Animais, o Artigo 8º proclama: i.) A experimentação animal que implique um sofrimento físico ou psicológico é incompatível com os direitos do animal, quer se trate de experimentos médicos, científicos, comerciais ou qualquer que seja a forma de experimentação; ii.) As técnicas alternativas devem ser utilizadas e desenvolvidas (Tinoco, 2010).

De fato, métodos alternativos podem ser definidos como qualquer método que possa ser usado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais na pesquisa biomédica, ensaios ou ensino. Baseado no princípio dos 3Rs (Reduction, Refinement e Replacement) para o uso de animais, que explica a redução, como obtenção de nível equiparável de informação com o uso de menos animais; o refinamento promove o alívio ou a minimização da dor, sofrimento ou estresse do animal; a substituição estabelece que um determinado objetivo seja alcançado sem o uso de animais vertebrados vivos (CONCEA, 2016).

Também é importante citar a Lei Arouca, que contribuiu para significativos avanços, principalmente no que concerne à regulamentar a utilização de animais em práticas didáticas ou científicas, no sentido de impor limites ao uso, levando em consideração, o máximo

possível, a proteção dos animais, visto que preconiza o planejamento do experimento a fim de se utilizar o menor número possível de animais e evitar estresse, dor ou sofrimento desnecessário (CONCEA, 2016).

Diante do exposto, há de se considerar a possibilidade de que a experimentação animal, sobretudo voltada a pesquisas científicas, não deve ser necessariamente banida, já que o avanço obtido no conhecimento de fisiologia, farmacologia e patologia não teria sido possível sem estudos *in vivo*. Porém, seu uso ocorrerá com muitos critérios a serem obedecidos, muita cautela e uso consciente de animais. Contudo, a redução será de fato significativa.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. ASPECTOS LEGAIS DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA**

De acordo com as Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Material Biológico do MS, o RABV, é dividido em amostras de vírus fixo e vírus de rua, e está classificado como classe de risco biológico 2 e classe de risco biológico 3, respectivamente (Brasil - Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Agentes Biológico 2008).

Ressalta-se que as amostras selecionadas só foram utilizadas neste estudo após autorização pela Diretoria do IEC (Anexo A) e pela aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) registrado com o nº 03/2020, portanto estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) deste Instituto (Anexo B). Todo procedimento que envolveu a manipulação das cepas virais do RABV foi realizado em cabine de segurança biológica classe IIB2 em laboratório Nível de Segurança Animal 2 (NBA2), sendo utilizados os seguintes EPIs: jaleco, touca descartável, luvas descartáveis, máscara descartável e calçado fechado e os mesmos seguiram estritamente as Normas de Biossegurança estabelecidas pela Instituição. Também, os profissionais que atuam nesta área foram previamente imunizados e suas condições imunológicas avaliadas regularmente (Kaplan, 1996; Woldehiwet, 2002).

O processamento das amostras se deu entre o período de 17 de Fevereiro de 2020 a 02 de julho de 2020. E foram analisadas um total de 215 amostras, provenientes de 06 espécies de animais sendo: 21 Bovinos; 42 Caninos, cinco (05) Equinos, seis (06) Felinos, dez (10) Símios e por fim, 66 Quirópteros sendo (66 encéfalos e 65 glândulas salivares, somente nas técnicas de isolamento).

#### 4.2. AMOSTRAS

Para a realização deste trabalho, foram conduzidos estudos experimentais a partir de amostras de tecido nervoso de diferentes espécies de animais, entre eles: caninos, felinos, bovinos, quirópteros e outros, que foram recebidos no laboratório de diagnóstico de raiva do IEC no período de vigência deste projeto, encaminhados pelas Unidades das Secretarias de Saúde e Agências de Defesa Agropecuária dos Estados brasileiros da região amazônica.

Para a implantação e padronização da técnica de IVCC foi utilizado um total de 215 amostras de tecido nervoso de caninos, felinos, bovinos, equinos, símios e quirópteros. Destes últimos também utilizamos a glândula salivar (Quadro 3). Para fins de comparação entre as técnicas, foram mantidos os procedimentos de diagnóstico laboratorial, recomendados pelo Ministério da Saúde de acordo com o Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva, que preconiza o uso das técnicas de IFD, PB e IVCC, sendo que dos isolamentos, os mesmos ocorreram de forma simultânea ou seja, ocorreram seguidos no mesmo dia, para se manter uma avaliação mais precisa entre as técnicas (Brasil, 2008).

**Quadro 3 – Total de amostras por espécie animal nas três técnicas de diagnóstico: IFD, IVC e IVCC**

ESPÉCIE ANIMAL / AMOSTRAS	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO		
	IFD	IVC	IVCC
Bovina (Encéfalo)	21	21	21
Canina (Encéfalo)	42	42	42
Equina (Encéfalo)	5	5	5
Felina (Encéfalo)	6	6	6
Quiróptero (Encéfalo)	66	66	66
Quiróptero (G. salivar)	-	65	65
Símio (Encéfalo)	10	10	10
<b>TOTAL</b>	<b>150</b>	<b>215</b>	<b>215</b>

Legenda: - técnica não aplicada para a amostra. **IFD**, Imonofluorescência Direta. **IVCC**, Isolamento Viral em Cultivo celular. **IVC**, Isolamento Viral em Camundongo.

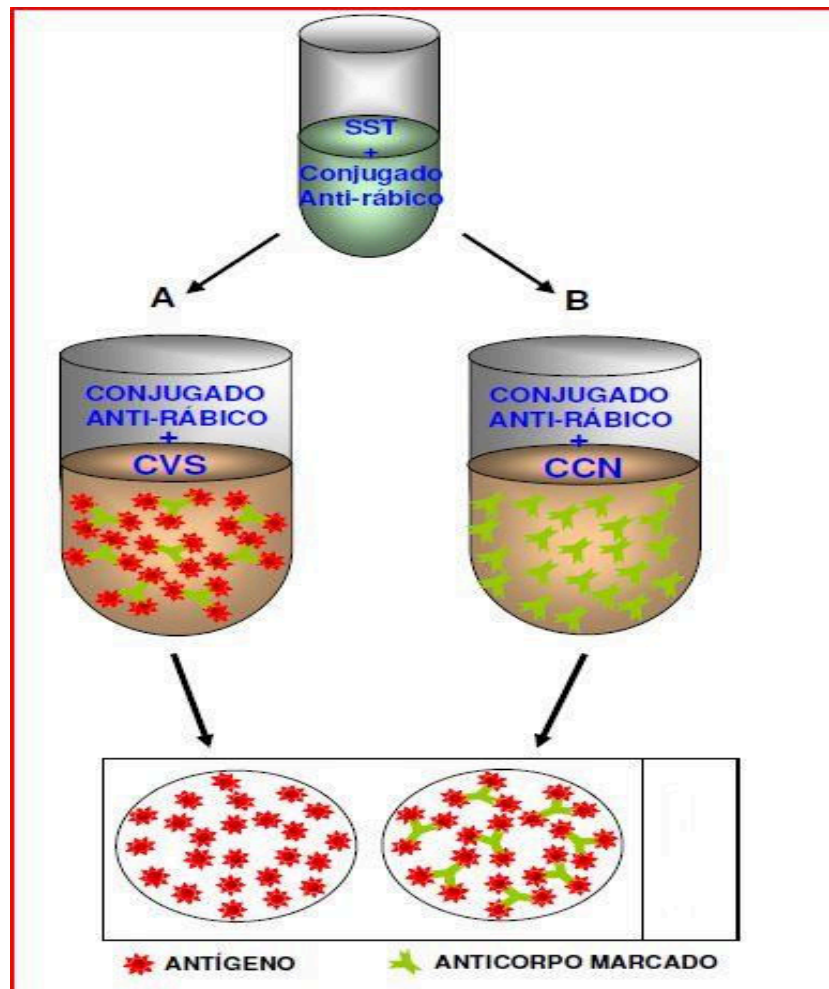
#### 4.3 – IMUNOFLUORESCENCIA DIRETA (IFD)

A técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) utilizando anticorpos fluorescentes (imunoglobulinas antirrábicas marcadas com isotiocianato de fluoresceína = conjugado antirrábico) se constitui em um método rápido, sensível e específico de diagnosticar a infecção pelo VRAB (Brasil, 2008).

Foram preparadas lâminas com a impressão do material suspeito das 150 amostras, de acordo com o seu recebimento no laboratório como descrito por Dean *et al.* (1996). De acordo com protocolo da técnica em nosso laboratório, as amostras de glândula salivar de quirópteros são consideradas impróprias para fixação em lâminas e não são testadas, para cada amostras de herbívoros são confeccionadas 03 (três) lâminas. As lâminas foram devidamente identificadas com o número de registro, assim como lâminas de controle positivo e negativo. Após secas, foram fixadas em acetona á -20°C por no mínimo 30 minutos. As impressões foram cobertas com o conjugado previamente diluído a 20% (Figura 6), sendo que à impressão mais distante, com a diluição **A** (suspensão de “*Challenge Virus Standard*” - CVS contendo conjugado previamente titulado) e a impressão mais próxima da identificação com a diluição **B** (suspensão de Cérebro de Camundongo Normal (CCN) + conjugado previamente titulado) Seguida da incubação em câmara úmida 37°C por 30 minutos. Segue-se a lavagem do material em tampão fosfato-salino (PBS), com pH de 7.4 a 7.8, e ficando submersas durante 10 minutos. As lâminas foram secas em temperatura ambiente (TA). Quando secas foram montadas com glicerina tamponada pH 8.5 em cada impressão, e cobertas com lamínulas (Ferreira, 2007).

As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência, marca ZEISS. Para cada teste foram utilizados controles positivos e negativos, o que assegurou a qualidade do exame. Nas lâminas com material positivo foram observadas estruturas de cor verde-maçã dotadas de brilho intenso. Já naquelas negativas somente foram observados o tecido nervoso. (Brasil, 2008).

**Figura 6 - Esquema da técnica de IFD. (A) Antígenos ligados ao anticorpo marcado e impressão de cérebro em antígenos livres. (B) Anticorpos livres e posterior ligação dos mesmos aos antígenos da impressão de tecido nervoso.**



Fonte: Barbosa, 2007.

#### 4.4. ISOLAMENTO VIRAL EM CAMUNDONGO (IVC) OU PROVA BIOLÓGICA (PB)

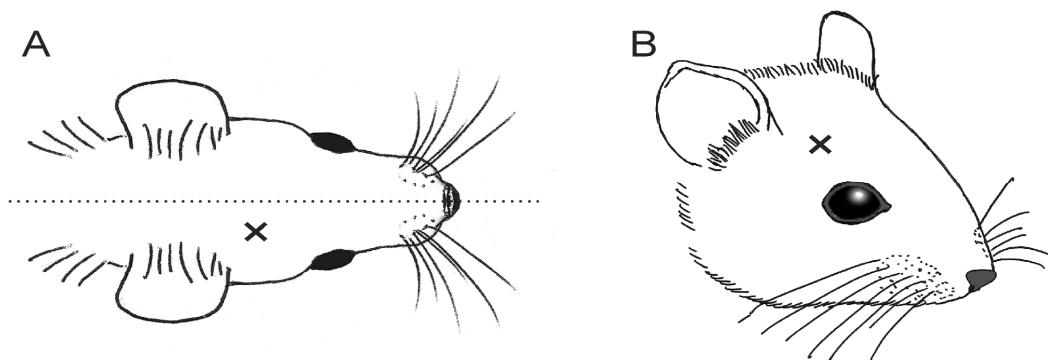
Para esta técnica foi preparada uma suspensão a 20% (peso/volume) a partir de SNC suspeito das 215 amostras selecionadas para os testes. Os espécimes foram pesados 0,75g de cada espécime em balança eletrônica de precisão, marca: Electronic Balance, modelo: BL-3200AS-BI. Em seguida macerados em grau, com auxílio de um pistilo e depois adicionado aos poucos 3mL da solução para preparo de Suspensão de Tecido Nervoso Suspeito até a total homogeneização do material, posteriormente a suspensão foi centrifugada a 3.000 rpm por 30 minutos, e o sobrenadante retirado e utilizado como inóculo.

Cada suspensão foi inoculada por via intracerebral em seis camundongos albino suíço recém-nascidos de acordo com a técnica preconizada por Koprowski (1996); (Castilho et. al., 2007). Os mini isoladores (gaiolas) onde os animais foram acondicionados, receberam alimento e água diariamente e estes foram devidamente identificados e alojados em biotério de experimentação animal nível 2 (NBA2).

As observações foram diárias e toda e qualquer alteração foi anotada nos cartões de inoculação para cada amostra. Esta leitura ocorreu por um período de 21 dias, com exceção de amostras provenientes de herbívoros e animais silvestres (P. ex. morcego) que foram observadas por 30 dias. Quando os camundongos mostraram sinais de doença, eles foram devidamente eutanasiados e seus encéfalos foram coletados e submetidos a um teste de IFD, para confirmação diagnóstica.

A inoculação pode ser realizada em diferentes áreas da calota craniana, entretanto recomenda-se fazer a injeção um pouco de lado da linha central para evitar a perfuração do seio venoso, no meio da linha imaginária entre o olho direito e a orelha direita do camundongo (Figura 7) (Geneva, 2018).

**Figura 7 – Local anatômico do camundongo mais adequado para realizar a inoculação intracerebral**



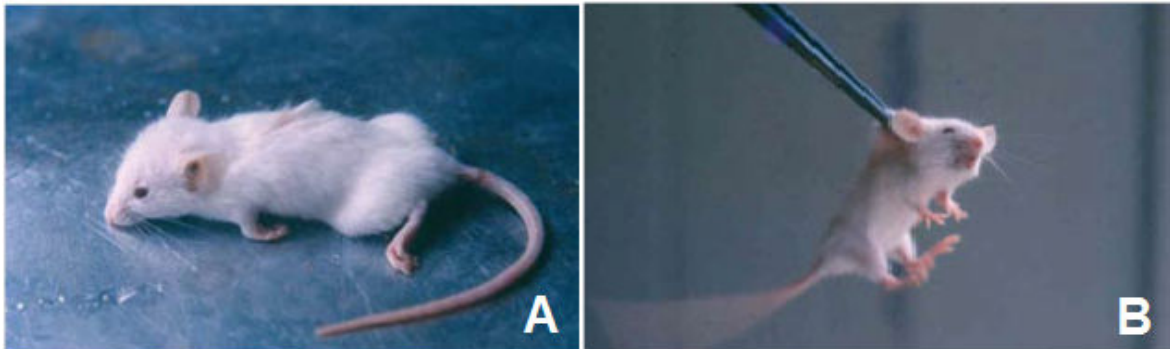
Fonte: Adaptado de (Brasil, 2008)

Os camundongos infectados com RABV adoecem geralmente, em cinco a dez dias, apresentando sinais clínicos sugestivos como: pêlos eriçados, tremores, agitação com movimento de saltos rápidos, aerofobia (Figura 8 A), paralisia (Figura 8 B) aerofobia. Esses sintomas ocorrem em média entre sete a quinze dias e culminando com o óbito do animal. No



entanto estes sinais clínicos não são suficientes para a positividade do teste, deve ser realizada a técnica de IFD em impressões de tecido nervoso desses animais (Kotait et. al., 2009; Geneva, 2018)

**Figura 8 - Camundongos inoculados com amostras positivas para raiva. Camundongo (A) apresentando paralisia e camundongo (B) apresentando aerofobia**



Fonte: Adaptado de (Brasil, 2008)

A remoção do cérebro do camundongo deve ser realizada em uma cabine de segurança biológica classe II. A carcaça do animal deve ser colocada no material de absorção limpa (tal como uma almofada de gaze ou uma toalha de papel), com a superfície ventral para baixo. A pele do pescoço e da cabeça é puxada com o auxílio de uma pinça e cortada com tesoura. O crânio é agarrado por uma pinça nas órbitas, é cortado por uma tesoura ou um bisturi expondo o cérebro. O cérebro é levantado pela tesoura ou bisturi, removidos do crânio e colocados sobre uma almofada de gaze ou de papel toalha limpo. A seção do cérebro imediatamente anterior ao cerebelo deve ser usada para fazer as impressões sobre uma lâmina de microscópio (Geneva, 2018).

A eutanásia deve ser realizada através de intoxicação com dióxido de carbono. Por conseguinte, os animais devem ser colocados em uma câmara cheia com o ar ambiente dentro do qual o dióxido de carbono é fornecido com o aumento gradual da concentração, a uma taxa de 10-30% de volume por minuto. Os camundongos devem ser observados de perto para assegurar a eutanásia através da ausência de respiração e batimentos cardíacos e cianose da pele. Em qualquer caso, a eutanásia em um animal inconsciente deve ser confirmada através de um método secundário, tais como deslocamento cervical ou abertura torácica (Avma, 2013).

#### 4.5. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR (IVCC)

Para a implantação da IVCC foram necessárias algumas etapas. Inicialmente foi preparado o estoque celular a partir das células originárias da ATCC/USA e que foram gentilmente doadas pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA). Os critérios técnicos seguidos neste trabalho foram estabelecidos pelo laboratório de referência nacional para o diagnóstico da raiva, que é o Instituto Pasteur (IP) de São Paulo.

##### 4.5.1 Descongelamento celular

Devido à sensibilidade extrema das células N2A, foi necessário um tempo de adaptação das mesmas nas condições laboratoriais onde seria implantada a técnica. Além de todo o suporte de insumos e equipamentos para o sucesso da implantação. As células mantidas em Nitrogênio líquido acondicionadas em tubo de plástico foram descongeladas lentamente. Em seguida foram passadas para uma garrafa de plásticos de 25 cm, onde foi acrescentado 9mL do meio MEM (Meio Essencial Mínimo de Eagle), sendo a proporção de 1mL de célula (por gotejamento) para cada 9mL de MEM, mais 10 $\mu$ L de aminoácidos. A garrafa de 25 cm<sup>2</sup> então foi mantido por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub>. Passado este tempo, as células foram avaliadas ao microscópio a fim de observar a confluência daquelas que restaram, uma vez que neste processo muitas são perdidas em virtude do choque térmico recebido por elas durante o descongelamento. O MEM foi desprezado e, na garrafa, foi colocado um meio novo, sendo as células mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% em temperatura de 37°C por 96 horas.

##### 4.5.2 Manutenção das células

A etapa de manutenção celular é fundamental para o isolamento em cultivo celular, visto que, ela proporciona a manutenção da linhagem celular, seja para pronto uso como para estoque no laboratório. Obedecendo algumas etapas, como segue: Inicialmente desprezar o meio vertendo a garrafa e acrescentar 2,5mL de tripsina apenas para lavar a monocamada e



- 1:5 {160µL de PBS com azul de Evans + 40µL de conjugado puro}
- 1:10 {100µL de PBS com azul de Evans + 100µL de diluição 1:5}
- 1:20 {100µL de PBS com azul de Evans + 100µL de diluição 1:10}
- 1:40 {100µL de PBS com azul de Evans + 100µL de diluição 1:20}
- 1:80 {100µL de PBS com azul de Evans + 100µL de diluição 1:40}
- 1:160 {100µL de PBS com azul de Evans + 100µL de diluição 1:80}
- 1:320 {100µL de PBS com azul de Evans + 100µL de diluição 1:160}

#### 4.5.4 Isolamento Viral em Cultivo Celular (IVCC)

A técnica de IVCC se baseia na inoculação de 40µL de suspensões de SNC a 20% e/ou glândula salivar quando se trata de morcegos, em placas utilizando células, seguida pelo exame microscópico da célula “tratada” com conjugado específico e submetida à luz ultravioleta. O antígeno rábico, reagindo com o conjugado e iluminado com luz ultra (comprimento de onda de 260 nanômetros), emitindo uma luz de cor esverdeada fluorescente (Brasil, 2008).

O isolamento *in vitro* do RABV em culturas celulares foi realizado em microplacas com 96 poços, seguindo o protocolo descrito por Webster e Casey (1996). A suspensão foi a mesma utilizada para o IVC/PB, a qual foi diluída em Meio Mínimo Essencial (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino e com células de neuroblastoma de camundongo, diluídas em MEM, estas também (suplementadas com 0,3mM de aminoácidos não essenciais e Gentamicina). As células foram utilizadas em uma concentração de aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/mL, resultando em uma suspensão cerebral final de 4%. Cada suspensão foi inoculada em triplicata nas placas sendo utilizados os controles positivos e negativos visando garantir a qualidade interna do teste. As placas foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> por 96 horas. Após esse tempo, o meio foi removido e as células aderidas às placas foram fixadas com acetona a 80%, durante 15 min. Em seguida a reação foi revelada por IFD, como descrito por Dean et. al. (1996) , com pequenas modificações, onde utilizou-se o conjugado anti-rábico policlonal antinucleocapsídeo, e em seguida, as placas foram incubadas a 37°C durante 1 hora. Logo após, as células foram lavadas três vezes em tampão fosfato salina (pH 7,4) e em água destilada, em seguida as placas foram secas por 15 minutos com o

auxílio de um secador. Após esse tempo foi adicionado em cada orifício da placa 50 $\mu$ L de glicerina a 10% (Castilho et. al., 2007).

A leitura das placas nos orifícios foi realizada em microscópio invertido de luz ultravioleta marca Olympus, modelo IZ71, nos orifícios com presença de antígeno pôde ser observadas estruturas de cor verde-maçã, dotadas de brilho intenso, de tamanho variável, nos orifícios com ausência de antígeno, não foram observadas inclusões fluorescentes (Brasil, 2008).

#### 4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram mantidos os procedimentos de diagnóstico, recomendados pelo Ministério da Saúde de acordo com o Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva, que preconiza o uso das técnicas de IFD, IVC e IVCC, sendo que destas últimas, as mesmas ocorreram de forma simultânea (Brasil, 2008).

Neste trabalho foram avaliados a sensibilidade e a especificidade da técnica de IVCC comparada as técnicas de rotina que são a IVC/PB e a IFD. Além de ser avaliada a IVCC na rotina laboratorial, foi aplicado o teste estatístico Kappa. As análises estatísticas foram realizadas no programa Bioestat 5.3. O nível de significância adotado foi de 5%.

## 5- RESULTADOS

### 5.1 - PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras foram testadas simultaneamente nas técnicas de IFD, IVCC e IVC.

Sobre as amostras de glândula salivar dos quirópteros, as mesmas não foram testadas na IFD, somente nas técnicas de IVCC e IVC. Destas, 65 amostras foram examinadas e 62 foram negativas. As outras 03(três) foram positivas tanto na IVC como na IVCC. Convém explicar que da glândula salivar não é feita a IFD em virtude da consistência desta amostra não permitir que a impressão fixe em lâmina durante o teste. Outro resultado interessante obtido foi nas amostras de Equinos, onde foram examinados 05 (cinco) espécimes. Destas, duas amostras foram positivas na IFD e três (03) negativas. Uma (01) amostra foi positiva nas técnicas de IVC e IVCC e quatro (04) negativas. Das espécies Bovina, Canina, Felina, Quiróptera (encéfalo) e Símia os resultados foram iguais para as três técnicas (Quadro 4).

**Quadro 4 – Amostras testadas segundo espécie e resultado de IFD, IVC e IVCC.**

ESPÉCIE ANIMAL	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO					
	IFD		IVC		IVCC	
	P	N	P	N	P	N
Bovina	10	11	10	11	10	11
Canina	0	42	0	42	0	42
Equina	2	3	1	4	1	4
Felina	0	6	0	6	0	6
Quiróptero (Encéfalo)	3	63	3	63	3	63
Quiróptero (G. salivar)	-	-	3	62	3	62
Símia	0	10	0	10	0	10
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>	<b>135</b>	<b>17</b>	<b>198</b>	<b>17</b>	<b>198</b>

Legenda: - técnica não aplicada para a amostra **IFD**, Imonofluorescência Direta. **IVCC**, Isolamento Viral em Cultivo celular. **IVC**, Isolamento Viral em Camundongo. **P** (POSITIVO), **N** (NEGATIVO)

## 5.2 - TRATAMENTO ESTATÍSTICO

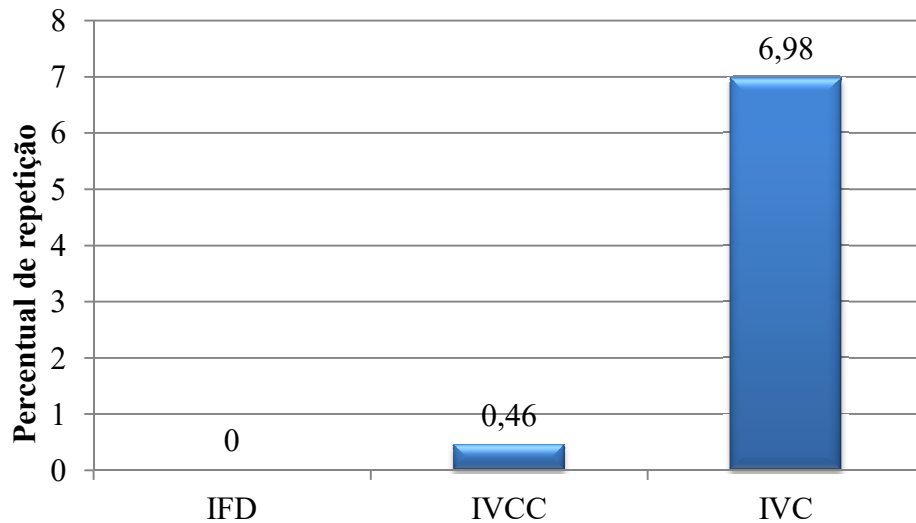
Através da aplicação do teste estatístico Kappa, verificou-se a concordância entre os resultados das técnicas. Os resultados comparativos entre as técnicas IVCC e IVC foram iguais, sensibilidade e especificidade de 100%. Já entre as técnicas de IFD e IVCC mostrou uma sensibilidade de 93,3% e especificidade de 100%. O mesmo se observou quando comparadas as técnicas de IFD e IVC. O índice de Kappa avaliou como excelente a concordância entre as técnicas (Índice de kappa=0,96,  $p < 0,0001$ ). Evidenciando maior sensibilidade para a técnica de IFD.

## 5.3 - COMPARAÇÃO DO TEMPO ENTRE AS TÉCNICAS DE IFD, IVCC E IVC.

Em relação ao tempo decorrido para cada teste, na técnica de IFD o tempo de duração variou de 2 a 4 horas para as 153 amostras testadas, essa variação de tempo se deu em decorrência da quantidade de lâminas a serem examinadas, não foi necessário realizar repetição de teste. Na técnica de IVCC, das 215 amostras testadas, 214 levaram 96 horas (quatro dias) para produzir resultados definitivos. Apenas uma amostra de um Equino, foi submetida a uma repetição, visto que a mesma havia apresentado resultado positivo na IFD, o que aumentou o tempo do seu resultado para 192 horas (oito dias).

Na técnica de IVC/PB, as 198 amostras negativas foram subdivididas em dois grupos; somente amostras de carnívoros (caninos e felinos) teve duração de 20 dias para confirmar os resultados e amostras das demais espécies levaram 30 dias para finalização. As 17 amostras positivas, apresentaram diferentes durações a partir do dia “zero” até o surgimento dos sinais clínicos da doença. Com um período mínimo de 07 dias e máximo de 14 dias. Um total de 15 amostras foi submetido à reinoculação, seguindo o protocolo da técnica, o que aumentou o tempo dos resultados de 30 dias para até 94 dias, nestas amostras, evidenciando que na execução da técnica de IVC as repetições ocorrem com maior frequência. Dentre os principais fatores para a reinoculação de amostras estão; canibalismo entre camundongos, morte da mãe no período de amamentação, mortes por outras doenças e amostra positiva na IFD que não consegue isolar no IVC. Foi aplicado o cálculo do percentual de repetição entre as três técnicas; IFD, IVCC e IVC, conforme a (Figura 10).

**Figura 10 – Taxa de repetições entre as três técnicas de IFD, IVCC e IVC.**



Legendas: IFD, Imonofluorescência Direta. IVCC, Isolamento Viral em Cultivo celular. IVC, Isolamento Viral em Camundongo.

#### 5.4 - USO DE ANIMAIS NA TÉCNICA DE IVC.

Para a realização da técnica de IVC/PB foram utilizadas 224 gaiolas (mini-isoladores). Sendo que em cada gaiola foram inoculados um total de seis camundongos por amostra. Perfazendo um montante de 1.568 animais. Quanto à eutanásia desses animais a mesma foi realizada depois de transcorrido o tempo de observação, logo para a definição do diagnóstico. O procedimento foi executado no infectório (NBA2) seguindo os protocolos de biossegurança que são utilizados para o biotério. As carcaças foram devidamente embaladas e coletadas por empresa especializada.

Quanto ao uso de animais, foram utilizados neste trabalho para a técnica de IVC, O total de 1.568 animais, foram analisados quanto ao bem-estar animal, as observações foram baseadas no princípio das Cinco Liberdades descrito no Código Sanitário para Animais Terrestres quais sejam: a Liberdade livre de fome e sede; Liberdade de desconforto; Liberdade da dor, lesões ou doença; Liberdade para expressar comportamento normal; Liberdade do medo e angústia, todos os animais foram observados, sendo as cinco Liberdades submetidas á três critérios de avaliação, quais sejam: I- atendida, II- não atendida e III- parcialmente atendida. Concluímos que uma destas foi atendida - Liberdade de Fome e Sede. Uma não atendida- Liberdade da dor, lesões ou doença. As outras três: Liberdade livre de desconforto, Liberdade para expressar comportamento normal, Liberdade do medo e angústia, foram considerada parcialmente atendida (Quadro 5).



**Quadro 5 – Análise do Bem-estar animal em camundongos usados na técnica de IVC.**

<b>LIBERDADES</b>	<b>CRITÉRIOS ANALISADOS</b>	<b>CONCLUSÃO</b>
Livre de fome e sede	Alimento: ração e água Reposição duas vezes por semana	Atendida
Livre de desconforto	Gaiolas medindo 28cm de comprimento, 17cm de largura e 12 cm de altura, com sete animais oferecendo espaço reduzido Variações de temperatura e umidade Ruídos Iluminação artificial	Parcialmente atendida
Livre de dor, lesão e doença	Animais inoculados com amostra potencialmente infectante Canibalismo Sequelas da inoculação Eutanásia Pré-disposição a outras doenças	Não atendida
Liberdade para expressar comportamento normal	Interações sociais pobres Falta de estrutura física para proteção contra ameaças externas Ausência de áreas complexas para permitir a exploração e busca de alimentos Espaço insuficiente para separar áreas de descanso, excremento e alimentos	Parcialmente atendida
Liberdade do medo e angústia	Perturbações pela presença humana Sofrimento psíquico, como andar em círculos e brigas	Parcialmente atendida

Legenda: IVC: Isolamento Viral em Camundongo

Dentro das atuais condições do infectório NBA2/3 da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas são disponibilizado instalações adequadas para a manutenção destes animais, tratadores exclusivos para o manejo, entrada controlada para evitar o estresse, treinamento para os profissionais que utilizam esta área e acompanhamento da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) fiscalizando todos os procedimentos e tratamento dos animais. O cenário ideal seria de fato, a não utilização de animais em experimentos, haja vista quando se tem a possibilidade real de um método comprovadamente eficaz e seguro para tal.

## 6 - DISCUSSÃO

É notória e inquestionável a importância do diagnóstico laboratorial da raiva para a prevenção, controle e conhecimento da realidade epidemiológica dessa doença, visto que, muitas vezes o diagnóstico clínico pode não ser definitivo, uma vez que os sintomas da raiva não são específicos. A Imunofluorescência Direta (IFD) é a técnica recomendada pela OIE e OMS para o diagnóstico deste agravo em todo o mundo, por apresentar resultados rápidos bem como alta sensibilidade ao RABV, porém podem ocorrer resultados falsos negativos, porquanto se recomenda a realização de uma segunda técnica, como critério confirmatório da IFD (Castilho et. al., 2007).

O Isolamento Viral em Camundongo (IVC) faz-se necessário para a confirmação, logo também, é uma técnica recomendada pelas organizações responsáveis. O IVC apresenta altos índices de sensibilidade ao RABV porém, possui algumas desvantagens como longo tempo para definição do diagnóstico, alto custo para manutenção de um biotério e um número elevado no uso de animais (Corona et . al., 2017).

O cultivo celular compreende um conjunto de técnicas que permitem manter células e tecidos *in vitro*, conservando ao máximo as suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e genéticas. Atualmente, a cultura de células não se limita apenas ao estudo do comportamento de tecidos e células. Seu uso se estende também à medicina, visto que possuem um importante papel no tratamento de doenças degenerativas. O sucesso do isolamento do RABV em cultivo celular é muito expressivo, logo a substituição da IVC pela IVCC tem sido recomendada (Castilho et. al., 2007).

Acerca da única amostra de equino que apresentou um resultado falso negativo nas técnicas de IVCC e IVC, ressalta-se que o total êxito no diagnóstico da raiva pode depender de alguns fatores, especialmente do estado de conservação do material a ser examinado, mas também da região do encéfalo a ser testada, isto porque a distribuição do VRAB não ocorre de forma homogênea. Quando se trata de equinos, a maior concentração de antígeno está na região do tronco cerebral e medula espinhal o que produz lesões graves nesses animais o que os leva a morrer antes mesmo de o vírus atingir o sistema nervoso central (Barrosa et. al., 2017).

O número de casos positivos em equinos pode ser subestimado, visto que a coleta destas amostras muitas vezes ocorre no campo, em condições muito precárias de segurança, logo se opta por retirar um fragmento muito superficial do tecido nervoso, não sendo a parte

mais rica em antígeno, além de que as pesquisas sobre a doença nessa espécie serem escassas na literatura (Barrosa et al., 2017).

Assim como neste trabalho, Barrosa et al., (2017) avaliaram as técnicas de IFD e IVC e encontraram uma concordância substancial entre a IFD e o IVC para equinos (coeficiente Kappa = 0,61) e excelente concordância para bovinos (coeficiente Kappa = 0,91), evidenciando maior sensibilidade para o IVC.

Semelhante dificuldade também foi encontrada por Castilho et al., (2007), que relataram, em seu estudo a técnica de IVCC ser muito exitosa em morcegos, bovinos e caninos, porém, conflitante nos equinos. E recomenda que, para estes animais em especial, sejam também utilizadas técnicas de biologia molecular para fins de confirmação do resultado da IFD e assim garantir uma celeridade no diagnóstico definitivo.

Já Kanitz et al.(2015), também encontraram resultado falso negativo, porém em bovinos quando testadas na IFD, e que a mesma foi positiva tanto no IVCC, inclusive testando duas linhagens diferentes de células (N2A e BHK-21) e IVC. Tal autor sugeriu que a amostra em questão possivelmente apresentava baixa carga de vírus, porém quando em condições ótimas se replicou tornando possível o isolamento do RABV nas técnicas de IVCC e IVC, o que contribuiu para o aumento da Sensibilidade dessa técnica em relação à IFD.

Yang et al., (2012), testaram 110 amostras de bovinos cães domésticos e cães-guaxinim provenientes da Coréia e compararam os resultados obtidos na IFD, com as técnicas de IVCC, utilizando células N2A RIDA (Teste Rápido de Imunodiagnóstico) e RT-PCR. Verificaram índices de sensibilidade e especificidade de 100% para as técnicas de IVCC, e RT-PCR, já a técnica de RIDA apresentou sensibilidade de 95% e especificidade de 98.9%.

Nogueira (2004) também realizou um estudo comparativo, porém entre linhagens celulares utilizadas para a IVCC, sendo as células N2A, considerada o método de referência e a linhagem celular McCoy, como um método alternativo. Seus resultados mostraram que as células N2A apresentaram 90% de sensibilidade e especificidade, enquanto que a célula McCoy, obteve 95% para os mesmos parâmetros. Concluindo que a célula McCoy obteve estimativas de acurácia superiores aos resultados com a célula de N2A, representando um método alternativo eficaz no isolamento do RABV. Ressaltou também a facilidade de se trabalhar com as células McCoy, além de seu custo de manutenção ser bem mais baixo que as N2A, pois utiliza meio nutritivo mínimo e necessita da metade de soro fetal bovino para suplementação. Entretanto, neste estudo foram utilizadas somente amostras de quirópteros,

sendo importante a utilização de amostras provenientes de outras espécies animais, para se fazer uma avaliação mais global.

Rudd e Trimarchi (1989), realizaram um árduo trabalho para determinar os melhores parâmetros associados ao procedimento da técnica de IVCC, utilizando células de N2A: tempo de centrifugação de suspensões, efeito das suspensões na infecção pelo RABV, ótimo período de incubação, uso de células ou monocamadas suspensas, uso substâncias inibidoras, decomposição de amostras e o uso de fixadores, além de comparar com as técnicas de IFD, e IVC, após 2 anos de ensaios, concluíram que a técnica de IVCC pode ser implantada com sucesso na rotina de um laboratório de diagnóstico de raiva, pois provou ser uma técnica confiável e tão sensível quanto o IVC, principalmente em amostras que apresentam pequenas quantidades de vírus, ou seja baixa carga viral.

Um estudo conduzido por Corona et.al., (2018), chegaram à conclusão semelhante, no que tange ao bem-estar dos animais, comparação entre as técnicas de isolamento e a melhora no bem-estar psicológico de seus funcionários, uma vez que não há o risco na manipulação dos animais como mordidas, risco de acidente com o material perfuro cortante, bem como o psicológico afetado frente ao procedimento de eutanásia. Além de seus custos e celeridade serem bem mais elevados que a IVCC.

Inquestionavelmente a técnica de IVCC apresenta maior rapidez na obtenção de resultados (4 dias) quando se compara com a IVC (até 30) dias, isto se reflete ainda quando há necessidade de se repetir uma amostra. Neste estudo, das 215 amostras testadas pela técnica de IVC, 15 precisaram ser reinoculadas, o que elevou o resultado do diagnóstico para até 94 dias. Esta superioridade da técnica de IVCC sobre a técnica de IVC quando comparada ao tempo de obtenção de resultado também foi relatado no estudo de Corona et.al.,(2018).

De acordo com a Coordenação da Qualidade da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) do IEC, para que uma técnica de diagnóstico *in vitro* seja implantada na rotina laboratorial, esta deve seguir as normas da ABNT NBR ISO 15189 2015 e ABNT NBR ISSO/IEC 17025 2017, ou seja, deverá passar pelo processo de validação de procedimentos analíticos, seguido da elaboração de todos os documentos associados com o desempenho da técnica, entre eles o seu Procedimento Operacional Padrão (POP), que após elaboração, verificação e aprovação pela Chefia da Seção deve estar disponível para consulta. Dessa forma no presente estudo foram confeccionados os POP da técnica de IVCC (Apêndice).

## 7 - CONCLUSÃO

- A técnica de IVCC encontra-se implantada no Laboratório de Diagnóstico da Raiva do IEC;
- Comprovação de que a técnica de IVCC contribui para um diagnóstico mais rápido e seguro;
- A técnica de IVCC esta em consonância com as diretrizes quanto ao bem-estar animal, uma vez que dispensa o uso de animais e suas aplicações;
- A manutenção de um estoque de células da linhagem N2A, possibilitará o apoio ao diagnóstico de outros agravos dentro da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas;
- Com a IVCC será possível à disponibilização de antígenos cultivados, para posterior análises antigênicas.
- A técnica de IVC pode ser substituída pela técnica de IVCC.
- Futuramente com a implantação da técnica de IVCC, esta servirá de aporte para a técnica de Soroneutralização do vírus da raiva.
- A técnica de IVCC demonstrou ser tão sensível quanto a técnica de IVC.
- O presente estudo possibilitou a construção de documentos de Procedimento Operacional Padrão (POP) da técnica de IVCC, que será importante na implantação da gestão da qualidade no laboratório de Diagnóstico de Raiva do IEC.

## 8. REFERÊNCIAS

- 123RF.COM **Diagram of Rabies virus particle structure**. 2020. Disponível em: [https://www.123rf.com/photo\\_25154195\\_diagram-of-rabies-virus-particle-structure.html](https://www.123rf.com/photo_25154195_diagram-of-rabies-virus-particle-structure.html). Acesso em: 17 jun. 2020.
- AVMA, AVMA. Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. **American Veterinary Medical Association, Schaumburg (IL)**, 2013.
- BABBONI, Selene Daniela; MODOLO, José Rafael. Raiva: Origem, Importância e Aspectos Históricos. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**: UNOPAR, São Paulo, v. , n. 13, p.349-356, 2011.
- BABY, J. et al. Natural Rabies Infection in a Domestic Fowl (*Gallus domesticus*): A Report from India. **PLoS Negl Trop Dis**, California, v. 9, n. 7, 2015.
- BARBOSA, Taciana Fernandes Souza. **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DO Vírus da raiva (Lyssavirus; Rhabdoviridae) ISOLADAS NO ESTADO DO PARÁ**. 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Universidade Federal do Pará, Belém, 2007.
- BARROSA, Noelle de Castro; LANGONI, Hélio; VICTÓRIA, Cassiano; MENOZZI, Benedito Donizete; MANTOVAN, Karine Bott; LATOSINSKI, Giulia Soares; JOAQUIM, Sâmea Fernandes. Results of laboratory diagnosis of rabies in herbivores (cattle and horses): a retrospective study. **Brazilian Journal Of Veterinary Medicine**, [S.L.], v. 40, p. 1-5, 2018. Revista Brasileira de Medicina Veterinária. <http://dx.doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm049218>.
- BARBOSA, Taciana Fernandes Souza et al. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA RAIVA NO ESTADO DO PARÁ NO PERÍODO DE 2000 A 2005: EMERGÊNCIA E TRANSMISSÃO POR MORCEGOS HEMATÓFAGOS (*DESMODUS ROTUNDUS*). **Caderno de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 15, p.329-348, 2007.
- BASAVARAJU, Sridhar V. et al. Encephalitis Caused by Pathogens Transmitted through Organ Transplants, United States, 2002–2013. **Emerging Infectious Diseases**, Geórgia, v. 20, n. 9, p.1443-1451, set. 2014.
- BASSUINO, Daniele Mariath. **CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E MAPEAMENTO DE LESÕES DA RAIVA EM MEDULA ESPINHAL DE BOVINOS E EQUINOS**, 2015. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- BATISTA, Helena Beatriz de Carvalho Ruthner; FRANCO, Ana Cláudia; ROEHE, Paulo Michel. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 125-144, 2007

BELOTTO, A. Oswaldo Cruz Foundation: An Institution in the Service of Life (FIOCRUZ). **Semana Uma Só Saúde**. Feira de Soluções para a Saúde: Saúde Única para Territórios Saudáveis e Sustentáveis. 31º Congresso dos Secretários Municipais de Saúde do Rio Grande do Norte, 2019. Disponível em: <<https://feirasolucoessaude.fiocruz.br>>. Acesso em 14/09/2020.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. **Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos**, 3ª edição. Série A, Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva**: Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Editora Ms, 2008. 110 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Controle da Raiva dos Herbívoros**: Manual Técnico 2009. 2. ed. Brasília: Mapa, 2009. P.125

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso**. 8. ed. Brasília: Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2010. 454 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Normas técnicas de profilaxia da raiva humana**. Brasília, 2014. 60 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses**. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis., 2016. 121 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**.3ªed. Brasília: Coordenação-geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços, 2017. 286 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (Ed.). **Raiva: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. 2019. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva>>. Acesso em: 05 abr. 2019.

CARNIELI JUNIOR, Pedro. **Caracterização Genética de Vírus da Raiva Isolados de Bovinos e Equinos no Período de 1997-2002 Em Área Epidêmica do Estado de São Paulo, Brasil**. 2009. 77 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CASTILHO, Juliana Galera 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, v. 4, n. 47, p.12-18, nov. 2007.



CETOAMORE, Natália Helena Frada. **Estudo da Neuroinvasividade do vírus da raiva em amostras do sistema nervoso central de bovinos.** 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterenária, Patologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

CHICARINO, Carla Nascimento. **Caracterização Molecular e Filogenética de Isolados do Vírus Rábico (Lyssavirus – Rhabdoviridae) em Espécimes Clínicos de Herbívoros no Estado Do Rio De Janeiro.** 2009. 219 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Animal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2009.

COETZER, Andre et al. Comparison of biotinylated monoclonal and polyclonal antibodies in an evaluation of a direct rapid immunohistochemical test for the routine diagnosis of rabies in southern Africa. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 9, p. e3189, 2014.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **NORMATIVAS DO CONCEA: PARA PRODUÇÃO, MANUTENÇÃO OU UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM ATIVIDADES DE ENSINO OU PESQUISA.** 3 ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, 2016. 387 p.

CORONA, Thaila Francini; BÖGER, Beatriz; ROCHA, Tatiana Carneiro da; SVOBODA, Walfrido Küh; GOMES, Eliane Carneiro. Comparative analysis of Mouse Inoculation Test and Virus Isolation in Cell Culture for rabies diagnosis in animals of Parana, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 39-43, fev. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0303-2017>.

COSTA, Lanna Jamile Corrêa da. **Investigação Sorológica Do Rabies Lyssavirus Em Morcegos e Conhecimentos e Práticas Relativas à Zoonose Raiva em Localidades de Risco no Nordeste do Estado do Pará, Amazônia Brasileira Bragança-PA 2016.** 2016. 134 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Ambiental, Universidade Federal do Pará, Bragança, 2016.

DACHEUX, L. et al. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. **Clin. Infect. Dis.** 47, 1410–1417, 2008.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASU, P. The fluorescence antibody test. In: **Laboratories Techniques in Rabies.** MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H.(eds.).Geneva, World Health Organization, 1996. p.88-95.

DUARTE, Leila; DRAGO, Maria Carmo. **A Raiva.**2005. 28 f. Tese (Doutorado) - Curso de Virologia, Universidade de Évora, Évora, 2005.

ESCOBAR, Luis E. et al. Bat-borne rabies in Latin America. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 1, p. 63-72, 2015.

FERREIRA, Rodrigo de Souza. **LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DA RAIVA NO ESTADO DE MINAS GERAIS NO PERÍODO DE 2002 A 2006.** 2007. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Agrárias, Universidade José do Rosário Vellano, Afenas, 2007.

FERRER, Moisés Tenório et al. Análise do risco ocupacional e do tratamento profilático antirrábico em agentes de endemia e de saúde. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**,[s.l.], v. 36, n. 3, p. 307-311, 2014.

FOOKS, Anthony R. et al. Emerging technologies for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21st century. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 9, p. e530, 2009.

FOOKS, Anthony R. et al. Rabies. **Nature Reviews Disease Primers**, Reino Unido, v. 3, p.17091-17109, 30 nov. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.91>.

GENEVA. WHO. . Classification of lyssaviruses. In: GENEVA. WHO. **Expert Consultation on Rabies: WHO Technical Report Series**. 1012. ed. Geneva: Who, 2018. Cap. 3. p. 10-15. (Third report.).

GENÈVE. WHO/ DEPARTMENT OF CONTROL OF NEGLECTED TROPICAL DISEASES. **Human rabies transmitted by dogs: current status of global data, 2015: Weekly epidemiological record**. 2016. Disponível em: <[https://www.who.int/rabies/resources/who\\_wer9102/en/](https://www.who.int/rabies/resources/who_wer9102/en/)>. Acesso em: 02 maio 2019.

GOMES, Alberio Antônio de Barros. **Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil**. 2004. 107 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GOMES, Andréia Patrícia et al. Raiva humana. **Revista Brasileira de Clínica Médica**., São Paulo, v. 4, n. 10, p.334-340, Agosto, 2012.

GONÇALVES, Marcio A.S.; SÁ NETO, Raymundo J.; BRAZIL, Tania K. Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 461-464, 2015.

HORTON, D. et al. Complex epidemiology of a zoonotic disease in a culturally diverse region: phylogeography of rabies virus in the Middle East. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003569 (2015).

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **Order: Mononegavirales**. 2019. Disponível em: <[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna\\_viruses/194/mononegavirales](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/194/mononegavirales)>. Acesso em: 12 mar. 2019.

KANITZ, Fabio Adriano *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, dez. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141690>.

KOPROWSKI, H.. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KAPLAN, M. M. Safety precautions in handling rabies virus. In: **Laboratories Techniques in Rabies**. MESLIN, F. X., KAPLAN, M. M., KOPROWSKI, H.(eds.). Geneva, World Health Organization, 1996. p. 03-08.

KOTAIT, Ivanete; CARRIERI, Maria Luiza; TAKAOKA, Neide Yumie. **Manual Técnico do Instituto Pasteur: Raiva – Aspectos gerais e clínica**. 8. ed. São Paulo: Instituto Pasteur, 2009. 57 p.

KOTAIT, Ivanete; OLIVEIRA, Rafael de Novaes; CARRIERI, Maria Luiza; CASTILHO, Juliana Galera; MACEDO, Carla Isabel; PEREIRA, Patrícia Mariano Cruz; BOERE, Vanner; MONTEBELLO, Lúcia; RUPPRECHT, Charles E. Non-human primates as a reservoir for rabies virus in Brazil. **Wiley Online Library, Zoonoses Public Health**, 1–13; 2018.

KUZMIN, Ivan V. et al. Complete genomes of Aravan, Khujand, Irkut and West Caucasian bat viruses, with special attention to the polymerase gene and non-coding regions. **Virus Research**, [s.l.], v. 136, n. 1-2, p.81-90, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2008.04.021>.

LEMBO, Tiziana et al. Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 2, p. 310, 2006.

LIMA, Everton Ferreira et al. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 250-264, 2005.

LIMA, Felipe Gouvêa de; GAGLIANI, Luiz Henrique. RAIVA: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CONTROLE E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL. **Revista Unilus Ensino e Pesquisa**, Santos, v. 11, n. 22, p.45-62, 2014.

MADHUSUDANA, Shampur Narayan; SUNDARAMOORTHY, Subha; ULLAS, Padinjarematthil Thankappan. 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**, v. 14, n. 12, p. e1067-e1071, 2010.

MARKOTTER, Wanda et al. Lagos bat virus virulence in mice inoculated by the peripheral route. **Epidemiology & Infection**, v. 137, n. 8, p. 1155-1162, 2009.

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

OIE. World Organisation for Animal Health. **Introduction to the Recommendations for Animal Welfare**. In: Terrestrial Animal Health Code, Animal Welfare. Chapter 7.1, Article 7.1.1.2019.

OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: 2004**. OIE. Office international des épizooties, 2004.

PEDROSA, Fernanda Gonzalez; CASEIRO, Marcos Montani; GAGLIANI, Luiz Henrique. PANORAMA DA RAIVA HUMANA NO BRASIL. **Revista Unilus Ensino e Pesquisa (RUEP)**, Santos, v. 15, n. 39, p.74-97, 2018.

PEREIRA, Armando de Souza. **Prevalência de raiva e perfil taxonômico em morcegos procedentes do Estado do Pará no período de 2005 – 2011**. 2012. 188 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Parasitária da Amazônia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará., Belém, 2012.

RIEDEL, Christiane; HENNRICH, Alexandru A.; CONZELMANN, Karl-Klaus. Components and Architecture of the Rhabdovirus Ribonucleoprotein Complex. **Viruses**, [S.L.], v. 12, n. 9, p. 959-971, 29 ago. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v12090959>.

RUDD, Robert J.; TRIMARCHI, Charles 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**, New York, v. 27, n. 11, p. 2522-2528, 2 ago. 1989.

RUPPRECHT, C. E. & Plotkin, S. in *Vaccines* (eds Plotkin, S., Orenstein, W. & Offit, P.) 646–668 (Elsevier, 2013).

RUPPRECHT, Charles E.; FOOKS, Anthony R.; ABELA-RIDDER, Bernadette. **Laboratory techniques in rabies**. 5. ed. Atlanta: World Health Organization, 302 p. 2018.

SANTOS, Gislaine Raquel. **CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DA RAIVA EM BOVINOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**. 2016. 80 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterenária, Universidade Estadual Paulista - Unesp Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2016.

SCHNEIDER, Maria Cristina et al. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 25, p. 260-269, 2009.

SILVA, Francelena de Sousa et al. Ampliação do acesso ao atendimento antirrábico humano em São Luís, Maranhão: relato de experiência/increasing access of human anti-rabies care in São Luís, Maranhão, Brazil: case report. **Revista de Pesquisa em Saúde**, Maranhão, v. 16, n. 3, 2016.

SOARES, Marcelo Luiz Medeiros et al. Raiva humana no cenário brasileiro. **Revista Saúde-UNG**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 80, 2017.

STEELE, J.H.; FERNANDEZ, P.J. History of rabies and global aspects. In: BAER, G.M. (Ed.) **The natural history of Rabies**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 1-24.

TEIXEIRA, Laura Helena Marcon; TOMAZ, Leonardo Aparecido Guimarães; LINHARES, Guido Fontgallad Coelho; SANTOS, Marli Francisca Cândida; JAYME, Valéria de Sá. DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DOS DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS DA RAIVA ANIMAL. **Ciência Animal Brasileira**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.144-157, mar. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1809-6891v16i131282>.

TINOCO, Isis Alexandra Pincella; CORREIA, Mary Lúcia Andrade. Análise crítica sobre a declaração universal dos direitos dos animais. **Revista Brasileira de Direito Animal**, v. 5, n. 7, 2010.

VIRALZONE. **Rhabdoviridae**. Swiss Institute of Bioinformatics, 2008. Disponível em: <[http://viralzone.expasy.org/2?outline=all\\_by\\_species](http://viralzone.expasy.org/2?outline=all_by_species)>. Acesso em: 22 mai. 2017.

WACHARAPLUESADEE, Supaporn; HEMACHUDHA, Thiravat. Ante-and post-mortem diagnosis of rabies using nucleic acid-amplification tests. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 10, n. 2, p. 207-218, 2010.

WALKER, P.J., Blasdel, K.R., Calisher, C.H., Dietzgen, R.G., Kondo, H., Kurath, G., Longdon, B., Stone, D.M., Tesh, R.B., Tordo, N., Vasilakis, N., Whitfield, A.E., and ICTV Report Consortium. 2018, [ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae](#), *Journal of General Virology*, 99:447–448

Webster W.A. & Casey G.A. 1996. Virus isolation in neuroblastoma cell culture, p.96-104. In: Meslin F.X., Kaplan M.M. & Koprowski H. (Eds), *Laboratory Techniques in Rabies*. 4th ed. World Health Organization, Geneva.

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

World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies, Second Report. WHO Technical Report Series, no. 982, 2013.

WHO, World Health Organization. 2016. Cell-culture isolation techniques. Disponível em: Acesso em: 28/02/2018.

WHO Expert Consultation on Rabies, third report. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO Technical Report Series, No. 1012; <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272364/9789241210218-eng.pdf>, accessed 8 May 2018).

WUNNER, William H. et al. The Molecular Biology of Rabies Viruses. **Reviews Of Infectious Diseases**, Chicago., v. 10, n. 4, p.771-784, Nov./Dec. 1988.

YANG, Dong-Kun; SHIN, Eun-Kyung; OH, Yoon-I; LEE, Kyung-Woo; LEE, Chung-San; KIM, Seo-Young; LEE, Jeong-A; SONG, Jae-Young. Comparison of four diagnostic methods for detecting rabies viruses circulating in Korea. **Journal Of Veterinary Science**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 43-48, 2012. The Korean Society of Veterinary Science. <http://dx.doi.org/10.4142/jvs.2012.13.1.43>.

**ANEXOS**

## ANEXO A:



## AUTORIZAÇÃO PARA USO DE AMOSTRAS

Declaro para os devidos que autorizo o uso das amostras recebidas no Laboratório de Diagnóstico de Raiva da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, para o desenvolvimento do projeto de Mestrado intitulado "Padronização e Avaliação de Desempenho da Técnica de Isolamento do Vírus da Raiva (Rabv) em Cultivo de Células de Neuroblastoma Murino (N2A), e submetido Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Universidade Federal do Pará do mestrando Francisco Amilton dos Santos Paiva, sob orientação do Dr. Alexandre do Rosário Casseb e Co-orientação da Dra. Taciana Fernandes Souza Barbosa Coelho.

Ananindeua, 14 de outubro de 2020

*Taciana Fernandes Souza Barbosa Coelho*

Taciana Fernandes Souza Barbosa Coelho  
Responsável pelo Laboratório de Diagnóstico de Raiva

*p/ Márcio Roberto Terixeira Nunes*

Márcio Roberto Terixeira Nunes  
Chefe da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas

*Jorge Fernando Travassos da Rosa*

Jorge Fernando Travassos da Rosa  
Diretor do Instituto Evandro Chagas

Jorge Fernando Travassos da Rosa  
Diretor do Instituto Evandro Chagas  
IEC / SVS / MS

## ANEXO B

CEUA

CENP  
Centro Nacional de Primatas

## CERTIFICADO nº 03/2020

Certificamos que a proposta intitulada "**Padronização e avaliação de desempenho da técnica de isolamento do vírus da raiva (RABV) em cultivo de células de Neuroblastoma Murino (N2A)**", registrada com o nº 03/2020, sob a responsabilidade de **Taciana Fernandes Souza Barbosa Coelho**, está de acordo com os PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas CEUA/IEC, observando que o referido projeto fará estudos experimentais a partir de amostras de tecido nervoso de diferentes espécies animais pertencentes ao laboratório de diagnóstico de raiva do IEC-Instituto Evandro Chagas.

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Deverá ser encaminhado relatório incluindo os resultados finais da pesquisa, no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

Ananindeua-PA, 09 de abril de 2020.


Ana Cláudia Magalhães de Oliveira  
CEUA/SEAC/IEC/SVS/MS

Thiago Vasconcelos dos Santos  
Coordenador da CEUA/IEC/CENP



**APÊNDICES**

## APÊNDICE A

	<b>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS</b> <b>SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRÁGICAS - SAARB</b> <b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>POP SAARB 6.10 -001</b> Revisão: 01 Página 1 de 2 Data efetiva: xx/xx/2020
---	--	--

### ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA EM CULTURA CELULAR

Aprovado por:	Chefia da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas	xx/xx/ 2020
Verificado por:	Taciana Fernandes Souza Barbosa Coelho	xx/x/2020
Elaborado por:	Francisco Amilton dos Santos Paiva	xx/xx/2020

#### Sumário

#### 1 Objetivo

#### 2 Campo de aplicação

#### 3 Definições

#### 4 Siglas

#### 5 Responsabilidades

#### 6 Procedimentos


#### 7 Referências

#### 8 Documentos complementares

#### 9 Histórico do documento

Cópia Controlada



	INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRAGICAS - SAARB PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP	POP SAARB 6.10 -001 Revisão: 01 Página 2 de 11 Data efetiva: xx/xx/2020
---	---	--

## ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA EM CULTURA CELULAR

### 1- Objetivo

Estabelecer os procedimentos padrões para realizar o ensaio de Isolamento do vírus da raiva (VRAB), pela pesquisa da presença do antígeno em cultura celular no laboratório de Raiva na Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas – SAARB/IEC/SVS/MS.

### 2- Campo de aplicação

Diagnóstico Laboratorial de Raiva, a partir da replicação viral e detecção de antígenos virais em amostras clínicas suspeitas.

### 3- Definições

Para efeito deste POP aplicam-se as seguintes definições:

**Biossegurança:** segundo a OMS, o termo biossegurança tem como significado um conjunto de práticas preventivas para o trabalho em contenção a nível laboratorial, com agentes patógenos para o homem e para os animais.

**Conjugado antirrábico:** é o anticorpo (imunoglobulina) do VRAB marcado com um fluorocromo que é o Isotiocianato de Fluoresceína.


**Data efetiva:** corresponde à data da última aprovação do documento

**Isolamento viral em cultura de células N2A:** é um conjunto de técnicas que envolvem a distribuição e isolamento de células em um ambiente artificial (*in vitro*). Para este procedimento são utilizadas células da linhagem N2A, que são susceptíveis ao VRAB, logo tornando viável sua replicação e conseqüentemente o isolamento viral.

**N2A:** célula de neuroblastoma de camundongo, utilizada para o isolamento do VRAB devido a sua excelente susceptibilidade.

**Procedimento Operacional Padrão (POP):** documento que descreve como executar as atividades específicas dos serviços e/ou ensaios realizados.

**Registros:** meio onde se apresentam resultados obtidos ou evidências de atividades realizadas.

 <p><b>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS</b> DO GOVERNADOR DE PIAUÍ</p>	<p>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/ MS SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRAGICAS - SAARB PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</p>	<p>POP SAARB 6.10 -001 Revisão: 01 Página 3 de 11 Data efetiva: xx/xx/2020</p>
---	---	--

---

**ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA EM CULTURA CELULAR**

---

#### 4- Siglas

**IVCC** – Isolamento Viral em Cultura Celular

**N2A** – Neuroblastoma de camundongo

**EPI** - Equipamento de Proteção Individual

**EPC** - Equipamento de Proteção Coletiva

**NBA2** - Nível de Biossegurança 2

**ATV** – Tripsina Versene

**CO2** – Dióxido de Carbono

**CCN** – Cérebro Normal

**VRAB** – Vírus da raiva

**CVS** – *Challenger Virus Standard*

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**IFD** – Imunofluorescência Direta

**PBS** – *Phosphate Buffered Saline*

**SFB** – Soro Fetal Bovino

**rpm** – rotações por minuto


#### 5- Responsabilidades

As responsabilidades em relação ao acesso no laboratório são especificadas de acordo com os itens descritos abaixo deste procedimento

##### 5.1 Responsabilidades Técnicas

Cabe ao responsável técnico do Laboratório de Diagnóstico de Raiva ou seu substituto:

- a) Providenciar, garantir e registrar o treinamento dos técnicos que acessem o laboratório quanto às corretas práticas de utilização deste procedimento;
- b) Avaliar a eficácia do treinamento neste procedimento, de todos os técnicos;

	<b>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS</b> <b>SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRAGICAS - SAARB</b> <b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>POP SAARB 6.10 -001</b> Revisão: 01 Página 4 de 11 Data efetiva: xx/xx/2020
---	--	---

---

**ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA EM CULTURA CELULAR**

---

c) Autorizar e supervisionar o acesso e as ações de todo o corpo técnico que realiza ensaios, manutenções e outras atividades relacionadas ao laboratório.

**5.2- Responsabilidades do corpo técnico**

- a) Obedecer e seguir os procedimentos de Biossegurança estabelecidos pela instituição durante toda a permanência no laboratório;
- b) Seguir os procedimentos descritos neste POP, bem como os documentos referenciados;
- c) Comunicar imediatamente, o responsável pelo laboratório ou seu substituto, quando da ocorrência de qualquer acidente ou eventualidade fora dos critérios estabelecidos durante sua permanência no laboratório.


**6. Procedimentos**

**6.1- Métodos**

O Isolamento Viral em Cultura Celular consiste na inoculação de suspensões à 20% de amostras clínicas suspeitas em células da linhagem de neuroblastoma de camundongo (N2A) junto com anticorpos fluorescentes (Conjugado antirrábico). Seguido da submissão deste material à luz ultravioleta. O antígeno rábico reagindo, emite uma luz esverdeada fluorescente, com comprimento de ondas de aproximadamente 260 nanômetros.

**6.2- Material e equipamentos permanentes**

- a) Freezer -70°C
- b) Balança eletrônica de precisão
- c) Agitador magnético
- d) Cabine de Segurança Biológica – Classe II tipo A

 <p>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS <small>DO SECRETARIA DE SAÚDE DO PARÁ</small></p>	<p>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRÁGICAS - SAARB PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</p>	<p>POP SAARB 6.10 -001 Revisão: 01 Página 5 de 11 Data efetiva: xx/xx/2020</p>
---	--	--

---

**ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA EM CULTURA CELULAR**

---


- e) Estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C
- f) Microscópio de Fluorescência Invertido
- g) Microscópio Ótico Invertido
- h) Pipetador Automático para pipetas de vidro
- i) Micropipetadores multicanais de 20-200 µL
- j) Banho-maria

**6.3- Soluções e insumos**

- a) Solução para preparo de Suspensão de Tecido Nervoso Suspeito (ver IP SAARB 6.10 – 001 **Produção da Solução para preparo de Suspensão de Tecido Nervoso Suspeito**)
- b) PBS – *Phosphate Buffered Saline* ver (IP SAARB 6.10-007 **Preparo de PBS**)
- c) PBS com Azul de Evans ver (IP SAARB 6.10-005 **Preparo de PBS com Azul de Evans**)
- d) Glicerina a 10%
- e) Acetona 80%
- f) Água Destilada ou água Milli-Q
- g) Antibiótico (sulfato de gentamicina)
- h) Aminoácidos não essenciais
- i) Tripsina 0,2% e Versene 0,02%
- j) Soro Fetal Bovino
- k) Conjugado antirrábico

**6.3.1 Inoculação de suspensão de tecido nervoso suspeito em células de neuroblastoma de camundongos**

- a) Pesar o tecido nervoso em uma balança eletrônica (ver IT SAARB 6.10 – 001 **Utilização da balança eletrônica de precisão (Electronic Balance)**, modelo:BL-3200AS-BI), localizada na sala de necrópsia.


	<b>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS</b> <b>SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRÁGICAS - SAARB</b> <b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>POP SAARB 6.10 -001</b> Revisão: 01 Página 6 de 11 Data efetiva: xx/xx/2020
---	--	---

---

**ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA EM CULTURA CELULAR**

---

- b) O material coletado deve ser macerado dentro de um grau com auxílio de um pistilo e em seguida adicionar aos poucos a solução para preparo de Suspensão de Tecido Nervoso Suspeito (ver IP SAARB 6.10 – 001 **Produção da Solução para preparo de Suspensão de Tecido Nervoso Suspeito**) até a total homogeneização do material;
- c) Centrifugar o preparado (ver IT SAARB 6.10 – 002 - **Utilização da Centrífuga refrigerada (FANEM, modelo: 280R)**, a uma rotação de 3000 rpm por 30 minutos à uma temperatura aproximada de 4°C, em seguida transferir o sobrenadante para outro tubo;
- d) Marcar o número de cada placa correspondente ao seu protocolo com caneta.
- e) Preparar o meio de cultura que será utilizado conforme procedimento estabelecido (ver IP SAARB 6.10-008 - **Preparo da Suspensão celular**).
- f) Utilizando uma placa de polipropileno de 96 poços, inocular em triplicata a suspensão correspondente a uma amostra, um volume de 40µL por orifício. Para cada teste serão inoculadas também amostras de controles positivo e negativo. Durante esta etapa, a placa com as amostras devem ficar sobre o gelo (gelox).
- g) Adicionar 160µL do meio de cultura já pronto.
- h) Seguir adicionando, em cada orifício da placa, 100 µL da suspensão celular (ver **SAARB 6.10-008 - Preparo da Suspensão celular**) que deve ser preparada nesse momento. Nesta etapa retirar a placa do gelo.
- i) Fechar a placa e levar para uma estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, onde será incubada a 37°C por 96 horas.
- j) Passadas essa horas, remover o material da placa utilizando uma bomba de sucção. (ver IT SAARB 6.10 – 003 - **Utilização da Bomba de Sucção (AIR CADET, modelo7530-60)**).
- k) Colocar a placa sobre gelo e acrescentar 200µL de acetona 80% gelada (ver IP SAARB 6.10-009 - **Preparo da Acetona à 80%**) em cada orifício da placa para fixar as células, incubar por 15 minutos.

 <p>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS NO SECRETARIA DE SAÚDE DO PARÁ</p>	<p>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRÁGICAS - SAARB PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</p>	<p>POP SAARB 6.10 -001 Revisão: 01 Página 7 de 11 Data efetiva: xx/xx/2020</p>
--	--	--

---

**ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA EM CULTURA CELULAR**

---

- l) Desprezar a acetona em um recipiente de descarte, vertendo a placa.
- m) Secar a placa durante 15 minutos com o auxílio de um secador doméstico.
- n) Diluir o conjugado (ver item **6.3.3 Titulação do conjugado**) em PBS com o Azul de Evans, (conforme **IP SAARB 6.10-005 - Preparo de PBS com Azul de Evans**). Em seguida acrescentar 40µL do conjugado antirrábico diluído por orifício e incubar durante 60 minutos, em estufa úmida a 37°C.
- o) Desprezar o conjugado, vertendo a placa.
- p) Enxaguar a placa por submersão (3x) em PBS [1x] / pH 7.4, preparado conforme (ver **IP SAARB 6.10-007 - Preparo do PBS**).
- r) Repetir a etapa anterior, utilizando água destilada ou água Milli-Q.
- s) Secar a placa durante 15 minutos com o auxílio de um secador doméstico.
- t) Adicionar em cada orifício da placa 50µL, de glicerina 10% ver (IP SAARB 6.10-010 - **Preparo de Glicerina a 10%**)


**6.3.2- Leitura das placas**

- a) Examinar cada orifício da placa em microscópio invertido de luz ultravioleta. Nos orifícios em que há presença de antígenos, poderão ser observadas estruturas de cor verde maçã, dotadas de brilho intenso. O tamanho das inclusões pode ser variado: algumas são pequenas, chamadas de areia ou poeira antigênica, e outras apresentam o tamanho comparável ao dos corpúsculos de Negri.
- b) Nos orifícios onde não há presença de antígenos, não deverão ser observados inclusões fluorescentes, somente as células de cor vermelha.

**6.3.3- Titulação do conjugado**

- a) Preparar uma placa contendo suspensões de amostras conhecidamente positivas e negativas, seguindo o procedimento de rotina do laboratório. Quando chegar à fase



 <p>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS <small>DO SECRETARIA DE SAÚDE DO PARÁ</small></p>	<p>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRÁGICAS - SAARB PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</p>	<p>POP SAARB 6.10 -001 Revisão: 01 Página 8 de 11 Data efetiva: xx/xx/2020</p>
---	--	--

---


**ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA EM CULTURA CELULAR**

---

de acrescentar o conjugado, preparar as diluições abaixo acrescentando cada uma das diluições nos orifícios dessa placa, conforme indicado abaixo.

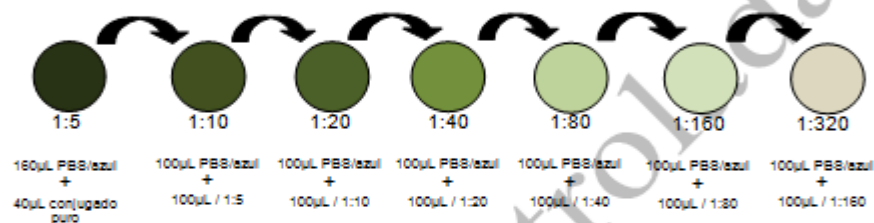
b) Preparo das diluições do conjugado

- Em uma placa, no primeiro poço pipetar 160 µL de PBS com azul de Evans + 40 µL de conjugado (total de 200 µL), obtendo-se uma diluição de concentração 1:5 e homogeneizar.
- Após a homogeneização, pipetar 100 µL da diluição acima (1:5) para o poço seguinte e acrescentar 100 µL de PBS com azul de Evans, obtendo-se agora uma diluição de concentração 1:10. Repetir esse procedimento sucessivamente. Desta forma serão obtidas diluições seriadas, como ilustração abaixo:
- 1:10 { 100µL de PBS com azul de Evans  
          { 100µL de diluição 1:5
- 1:20 { 100µL de PBS com azul de Evans  
          { 100µL de diluição 1:10
- 1:40 { 100µL de PBS com azul de Evans  
          { 100µL de diluição 1:20
- 1:80 { 100µL de PBS com azul de Evans  
          { 100µL de diluição 1:40

	<b>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS</b> <b>SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRAGICAS - SAARB</b> <b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>POP SAARB 6.10 -001</b> <b>Revisão: 01</b> <b>Página 9 de 11</b> <b>Data efetiva: xx/xx/2020</b>
---	--	--

### ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA EM CULTURA CELULAR

- 1:160 { 100µL de PBS com azul de Evans  
{ 100µL de diluição 1:80
- 1:320 { 100µL de PBS com azul de Evans  
{ 100µL de diluição 1:160




- Após o preparo das diluições do conjugado, estas devem ser adicionadas em todos os orifício da placa, contendo amostras positivas ou negativas, iniciando-se a sequencia pela diluição 1:10 da esquerda para a direita;
- Durante a leitura da placa, verifica-se qual o melhor título do conjugado;
- Esta escolha é baseada na intensidade da diluição em que as células não infectadas estão vermelhas e as células infectadas estão verde fluorescentes.

#### 6.4 Tipo de Amostras Biológicas utilizadas

- Cérebro, glândula salivar, LCR e saliva.

#### 7- Referências

	<b>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS</b> <b>SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRÁGICAS - SAARB</b> <b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>POP SAARB 6.10 -001</b> <b>Revisão: 01</b> <b>Página 10 de 11</b> <b>Data efetiva: xx/xx/2020</b>
---	--	---

---

**ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA EM CULTURA CELULAR**

---

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva. Brasília, 1ª edição, 2008.

CASTILHO, Juliana Galera *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, ano 2007, v. 4, n. 47, p. 12-18, 9 nov. 2007.

KOPROWSKY, H. The mouse inoculation test. In: **Laboratories Techniques in Rabies**. MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H.(eds). Geneva, World Health Organization, 1996, p. 80-87.

#### 8- Documentos complementares

IP SAARB 6.10-008 - Preparo da Suspensão celular

IP SAARB 6.10-009 - Preparo da Acetona à 80%

IP SAARB 6.10-005 - Preparo de PBS com Azul de Evans

IP SAARB 6.10-007 - Preparo do PBS

IP SAARB 6.10-010 - Preparo de Glicerina a 10%)

IP SAARB 6.10 – 001 - Produção do Reagente para preparo de Suspensão de Tecido Nervoso Suspeito


IT SAARB 6.10 – 001 - Utilização da balança eletrônica de precisão (Electronic Balance) modelo: BL-3200AS-BI

IT SAARB 6.10 – 003 - Utilização da Bomba de Sucção (AIR CADET), modelo: 7530-60.

IT SAARB 6.10 – 001 – Utilização do freezer – 70°C (INDREL), modelo: IULT 335.

IT SAARB 6.10 – 002 - Utilização da Centrífuga Refrigerada (FANEM), modelo: 280R

#### 9- Histórico do documento

	<b>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS</b> <b>SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRAGICAS - SAARB</b> <b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>POP SAARB 6.10 -001</b> Revisão: 01 Página 11 de 11 Data efetiva: xx/xx/2020
---	--	--

---

**ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA EM CULTURA CELULAR**

---

EDIÇÃO	DATA	HISTORICO	RESPONSÁVEL
00			

### 10 Validação de Procedimento técnico

A revisão atual acarretou mudança significativa deste procedimento, levando assim necessidade de uma nova validação da técnica realizada pelo laboratório?


Sim

Não

**Nota:** Se a revisão acarretou em mudança significativa do procedimento e a técnica descrita precisa ser validada, esta deve ser registrada no FO SAARB 6.0 - 025 Registro de validação de métodos de ensaios.



## APÊNDICE B

 <p><b>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS</b> <small>DO GOVERNADOR DO PARÁ</small></p>	<p><b>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRÁGICAS - SAARB PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b></p>	<p><b>POP SAARB 6.10 -004</b> Revisão: 01 Página 1 de 2 Data efetiva: xx/xx/2020</p>
---	---	--

### MANUTENÇÃO DE CÉLULAS N2A

Aprovado por:	Chefia da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas	xx/xx/ 2020
Verificado por:	Taciana Fernandes Souza Barbosa Coelho	xx/x/2020
Elaborado por:	Francisco Amilton dos Santos Paiva	xx/xx/2020

#### Sumário

#### 1 Objetivo

#### 2 Campo de aplicação

#### 3 Definições

#### 4 Siglas

#### 5 Responsabilidades


#### 6 Procedimentos

#### 7 Referências

#### 8 Documentos complementares

#### 9 Histórico do documento



 <p>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS</p> <p>DO GOVERNADOR DE PERNAMBUCO EM 2003</p>	<p>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRAGICAS - SAARB PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</p>	<p>POP SAARB 6.10 -004 Revisão: 01 Página 2 de 7 Data efetiva: xx/xx/2020</p>
--	--	---

---

**MANUTENÇÃO DE CÉLULAS N2A**

---

### 1.Objetivo

Padronizar a manutenção do cultivo de células de neuroblastoma de camundongo (N2A).

### 2.Campo de aplicação

Diagnóstico laboratorial do vírus da raiva. A manutenção do cultivo de células N2A permite que a técnica de isolamento e identificação do vírus da raiva possa ser realizada pelo isolamento viral em cultivo celular.

### 3.Definições

Para efeito deste POP aplicam-se as seguintes definições:

**Biossegurança:** segundo a OMS, o termo biossegurança tem como significado um conjunto de práticas preventivas para o trabalho em contenção a nível laboratorial, com agentes patógenos para o homem e para os animais.

**Data efetiva:** corresponde á data da ultima aprovação do documento

**Meio Essencial Mínimo de Eagle:** é um meio de cultura sintético de tecido animal desidratado, contendo nutrientes para o crescimento de células *in vitro*, que incluem sais de Eagle.


**N2A:** célula de neuroblastoma de camundongo, utilizada para o isolamento do vírus da raiva devido a sua maior susceptibilidade.

**Procedimento Operacional Padrão (POP):** documento que descreve como executar as atividades específica dos serviços e/ou ensaios realizados.

**Registros:** meio onde se apresentam resultados obtidos ou evidencias de atividades realizadas

**Soro Fetal Bovino:** soro originado de sangue total coagulado de doadores ou de abatedores oficiais, utilizado como fator de crescimento para células.

**Tripsina Versene:** enzima pancreática de origem bovina que tem como função principal a ação de soltar as células aderidas nas garrafas.

	<b>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS</b> <b>SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRÁGICAS - SAARB</b> <b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	<b>POP SAARB 6.10 -004</b> <b>Revisão: 01</b> <b>Página 3 de 7</b> <b>Data efetiva: xx/xx/2020</b>
---	--	---

---

## MANUTENÇÃO DE CÉLULAS N2A

---

### 4. Siglas

**ATCC** – American Type Culture Collection

**ATV** – Tripsina Versene

**CO2** – Dióxido de Carbono

**E-MEM** – Meio Essencial Mínimo de Eagle

**NBA2** - Nível de Biossegurança 2

**N2A** – Células de Neuroblastoma de Camundongo

**SFB** – Soro Fetal Bovino

### 5. Responsabilidades

As responsabilidades em relação ao acesso no laboratório são especificadas de acordo com os itens descritos abaixo deste procedimento

#### 5.1. Responsabilidades Técnicas


Cabe ao responsável técnico do Laboratório de Diagnóstico de Raiva ou seu substituto:

- a) Providenciar, garantir e registrar o treinamento dos técnicos que acessem o laboratório quanto às corretas práticas de utilização deste procedimento;
- b) Avaliar a eficácia do treinamento neste procedimento, de todos os técnicos;
- c) Autorizar e supervisionar o acesso e as ações de todo o corpo técnico que realiza ensaios, manutenções e outras atividades relacionadas ao laboratório.

#### 5.2. Responsabilidades do corpo técnico

- a) Obedecer e seguir os procedimentos de Biossegurança, no que tange ao uso de EPIs e EPCs obrigatórios durante toda a permanência no laboratório;
- b) Seguir os procedimentos descritos neste POP, bem como os documentos referenciados;



 <p><b>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS</b> DO GOVERNADOR DE PERNAMBUCO EM 2003</p>	<p>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRÁGICAS - SAARB PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</p>	<p>POP SAARB 6.10 -004 Revisão: 01 Página 4 de 7 Data efetiva: xx/xx/2020</p>
--	--	---

---

**MANUTENÇÃO DE CÉLULAS N2A**

---

c) Comunicar, em caráter imediato, o responsável pelo laboratório ou seu substituto quando da ocorrência de qualquer acidente ou eventualidade fora dos critérios estabelecidos durante sua permanência no laboratório.

**6.Procedimentos**

**6.1.Material e equipamentos permanentes**


- a) Incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C.
- b) Microscópio ótico invertido
- c) Pipetador automático para pipetas de vidro
- d) Banho Maria a 37°C
- e) Geladeira
- f) Cabine de segurança biológica
- g) Freezer -20°C
- h) Garrafas de plástico
- i) Ponteiras

**6.2.Soluções e insumos**

- a) Soro Fetal Bovino
- b) Meio de Cultura E-MEM
- c) Bicarbonato de Sódio (NaHCO<sub>2</sub>)
- d) Tripsina 0,2 e Versene 0,02
- e) Aminoácidos não essenciais





 <p><b>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS</b>  <small>DO GOVERNADOR DE PIAUÍ</small></p>	<p><b>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/ MS</b>  <b>SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRÁGICAS - SAARB</b>  <b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b></p>	<p><b>POP SAARB 6.10 -004</b>  Revisão: 01  Página 5 de 7  Data efetiva: xx/xx/2020</p>
---	--	---


---

**MANUTENÇÃO DE CÉLULAS N2A**

---

**6.3. Manutenção de Células N2A**

- a) Linhagem de células N2A originárias da ATCC são mantidas em garrafas de plásticos de 25 cm. Quando a célula se encontra na fase estacionária de crescimento é preciso realizar o repique celular, para evitar que as células morram e produzir o estoque para uso na rotina laboratorial.
- b) Retirar o meio de cultura preparado (conforme **IP SAARB 6.10-006 - Preparo do Meio para Manutenção de Células N2A**) da geladeira e a tripsina do Freezer, e colocar em banho-maria a 37°C.
- c) Limpar a cabine de segurança biológica com álcool a 70%. Colocar garrafas, ponteira, pipetas, pipetador automático, recipiente para descarte e ligar a luz ultravioleta por 15 minutos.
- d) Após 15 minutos desligar a luz ultravioleta e ligar o fluxo e a luz interna da cabine.
- e) Retirar a célula que será repicada da estufa, observar no microscópio invertido sua morfologia e verificar se o tapete celular está confluyente. Levar a célula para a cabine de segurança já pronta.
- f) Iniciar procedimento vertendo a garrafa com as células, a fim de desprezar o meio em um recipiente para descarte.
- g) Pipetar 2,5mL de ATV na garrafa contendo a monocamada, enxaguar e desprezar esta vertendo a garrafa do lado contrário da monocamada.
- h) Pipetar novamente 2,5mL de ATV na garrafa, mantendo-a deitada por 30 segundos para a tripsina agir sobre a monocamada. Verter a garrafa do lado contrário ao da monocamada e desprezar a ATV.

 <p><b>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS</b>  <small>DO GOVERNADOR DE PERNAMBUCO EM SAÚDE</small></p>	<p><b>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS</b>  <b>SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRÁGICAS - SAARB</b>  <b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b></p>	<p>POP SAARB 6.10 -004  Revisão: 01  Página 6 de 7  Data efetiva: xx/xx/2020</p>
---	---	--

---


**MANUTENÇÃO DE CÉLULAS N2A**

---

- i) Fechar a garrafa com a tampa e bater a garrafa com as mãos para que as células possam se soltar.
- j) Acrescentar 4mL do meio de cultura nessa garrafa contendo as células e ressuspender em torno de 10X com a pipeta para não formar grumos.
- k) Em seguida distribuir o conteúdo (4mL de meio + células) originado em 4 garrafas de 25cm (1mL em cada garrafa).
- l) Completar a garrafa com 9mL do meio de cultura, enriquecido com 10% de soro fetal bovino em cada uma dessas garrafas.
- m) Identificar cada garrafa com a linhagem da célula, o número de passagem e a data do repique.
- n) Guardar todas as garrafas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% em temperatura de 37°C durante 72 horas.
- o) Após esse período, as células estarão prontas para um novo repique ou para serem utilizadas na rotina laboratorial, para o isolamento viral.

**7.Referências**

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva. Brasília, 1ª edição, 2008.

 <p>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS NO REGISTRO DE PATENTES EM 2005</p>	<p>INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – IEC/ SVS/MS SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORRAGICAS - SAARB PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</p>	<p>POP SAARB 6.10 -004 Revisão: 01 Página 7 de 7 Data efetiva: xx/xx/2020</p>
---	--	---

---

**MANUTENÇÃO DE CÉLULAS N2A**

---

NBR ISO/IEC 17025 – Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração – Outubro 2005.

**8.Documentos complementares**

IP SAARB 6.10-006 Preparo do Meio para manutenção de células N2A.

**9.Histórico do documento**

EDIÇÃO	DATA	HISTORICO	RESPONSÁVEL
00			

**1- Validação de Procedimento técnico**

A revisão atual acarretou mudança significativa deste procedimento, levando assim necessidade de uma nova validação da técnica realizada pelo laboratório?

Sim

Não

**Nota:** Se a revisão acarretou em mudança significativa do procedimento e a técnica descrita precisa ser validada, esta deve ser registrada no FO SAARB 6.0 - 025 Registro de validação de métodos de ensaios.

