

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA RAIVA NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

*Paulo Michel Roehle,¹ Augusto César Cunha,¹ Rogério Ribeiro Rodrigues,¹
— Alexandre da Rocha Gonçalves² e Carmem Lúcia Garcez Ribeiro² —*

INTRODUÇÃO

O diagnóstico de raiva no estado do Rio Grande do Sul realiza-se, atualmente, nos laboratórios do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor" e no Laboratório Regional de Diagnósticos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. Outras unidades, como o laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, e o laboratório da Universidade Federal de Santa Maria, realizam o diagnóstico em caráter parcial, remetendo os materiais para confirmação ao Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor", laboratório de referência para o estado.

O objetivo deste trabalho é dar conhecimento aos profissionais ligados à área, sobre a situação do diagnóstico de raiva no período 1979-1984 (compreendendo a totalidade dos diagnósticos confirmados laboratorialmente no estado) e, ao mesmo tempo, permitir uma avaliação da sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico, para

maior suporte na orientação do tratamento de pessoas expostas à enfermidade. Os dados apresentados provêm do levantamento dos exames efetuados durante o período no Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor" e na Universidade Federal de Pelotas.

MATERIAIS

E MÉTODOS

Materiais para exame

Os materiais recebidos para exame foram classificados por espécie como caninos, bovinos e felinos e, como "outros", aquelas espécies para as quais só esporadicamente recebiam-se requisições para exame, por exemplo: cabras, cavalos, morcegos, macacos, saguis, coelhos, ovelhas, bem como encéfalos humanos. Quando possível, coletavam-se, em placas de Petri, fragmentos de cérebro, de cerebelo e de cornos de Ammon do material recebido que, após a preparação de lâminas e inóculos eram mantidos a -20°C .

¹ Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor", Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Medicina Veterinária, Pelotas, Rio Grande do Sul.

Pesquisa de corpúsculos de Negri

Utilizou-se o método de Tierkel (1) em que esfregaços de cérebro, de córtex e de cornos de Ammon, ainda úmidos, foram corados com o corante de Seller (2) durante um ou dois segundos, lavados em água corrente e secos com ar quente. As lâminas assim obtidas foram examinadas em microscópio ótico "Leitz" com objetiva de imersão 100 × e oculares 5 ×.

Imunofluorescência direta

Impressões de cerebelo, córtex e cornos de Ammon foram fixadas e coradas segundo técnica descrita por Dean e Abelseth (2), com exceção dos materiais recebidos em glicerina ou líquido de Vallée, fixados pelo calor e não em acetona (3).

O conjugado utilizado foi fornecido pela Fundação Serviços de Saúde Pública (Rio de Janeiro) ou pelo Centro Pan-Americano de Zoonose, Martínez, Buenos Aires, Argentina, e, ao chegar ao laboratório, cada parcela era titulada, fracionada e mantida em alíquotas a -20 °C até o momento de ser usada.

O preparo das suspensões de cérebro de camundongo normal e cérebro de camundongo infectado com vírus fixo realizou-se de acordo com a técnica descrita por Dean e Abelseth (2). As suspensões foram acrescentadas ao conjugado, no dia de uso, na proporção de 4:1. Para a leitura das lâminas utilizaram-se microscópios Leitz, modelo Ortholux, com lâmpada de halogênio 100 Watts, objetiva 40 ×, oculares 6 ×, filtro excitador BG 12 e filtro barreira K 510.

Inoculação em camundongo

A inoculação em camundongos obedeceu ao método descrito por Atanasiu (4), com suspensões de fragmentos de cérebro, cerebelo e cornos de Ammon preparadas a 10% em soro equino 2%, com 500 UI de penicilina/ml e 1 560 UI de estreptomomicina/ml, e centrifugadas a 1 500 rpm durante dez minutos, em uma centrífuga de mesa. Aplicou-se o inóculo assim preparado em seis camundongos lactentes de três a oito dias de idade, na dose de 0,03 ml por via intracerebral. Os cérebros dos camundongos mortos foram examinados pelos métodos de Seller e de imunofluorescência direta. Os animais sobreviventes ficaram sob observação por um período de 21 dias no mínimo.

RESULTADOS

A figura 1 apresenta o total dos materiais recebidos por ano e o total de amostras positivas para raiva e a figura 2 apresenta, por espécie, a percentagem de amostras positivas em relação ao número recebido.

Durante os seis anos considerados, examinaram-se 4 587 amostras, uma média de 764,5 por ano. O laboratório do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor" examinou 4 040 materiais (88,1%) e o laboratório da Universidade Federal de Pelotas examinou 547 amostras (11,9%). O 1984 foi o ano em que se recebeu o maior número de amostras para diagnóstico (901) e 1980 quando se recebeu o menor (676).

Do total de material recebido, 971 (21,2%) tiveram diagnóstico positivo — 367 caninos (8%), 539 bovinos (11,75%), 41 felinos (0,9%) e 24 de outras espécies (0,52%). O número total de positivos foi maior em 1984, com 310 ca-

FIGURA 1. Número de amostras recebidas por ano, por espécie, e número de diagnósticos positivos para raiva

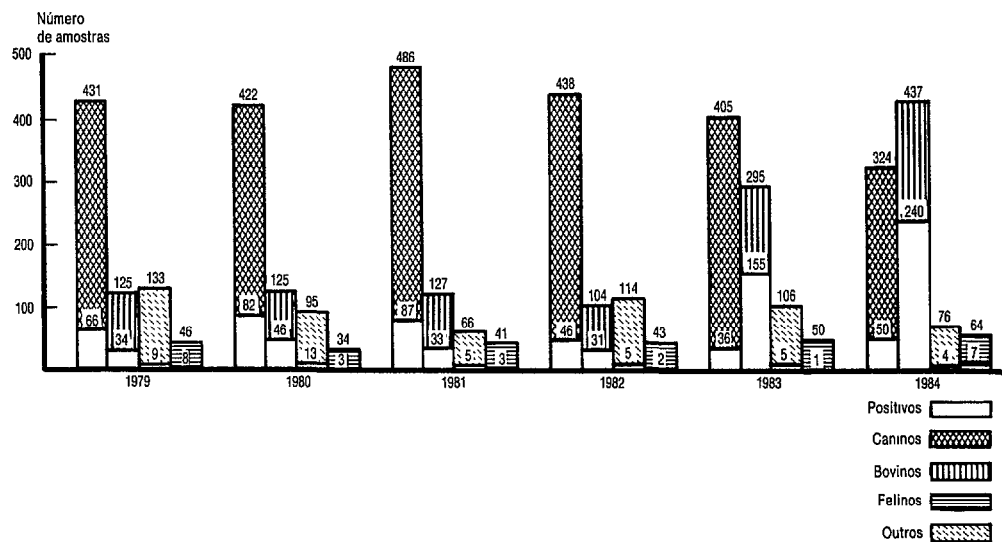
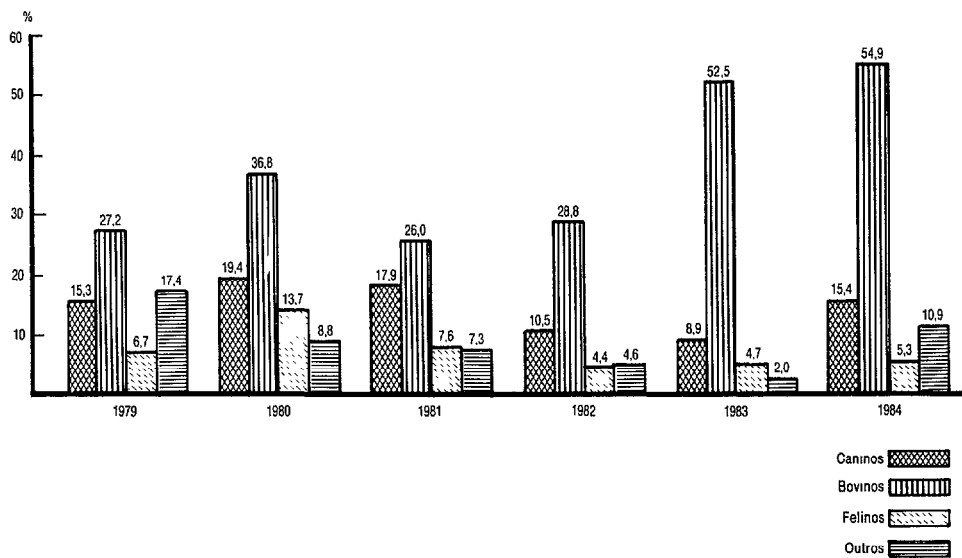


FIGURA 2. Percentagem de positivos em relação ao número de amostras recebidas por espécie, por ano



sos, ao passo que a menor incidência foi observada em 1982, com 84 casos. A média geral de positivos no período foi de 161,8 casos, embora muito elevada devido à incidência de casos em bovinos nos anos de 1983 e 1984.

As figuras 3, 4, 5 e 6 representam a distribuição mensal das amostras recebidas de todas as espécies bem como a distribuição mensal dos casos positivos.

Os casos positivos em caninos (figura 3), foram mais freqüentes nos anos de 1980, com 82 casos, e 1981, com 87 casos. A média mensal de casos positivos em 1979 foi 5,5; em 1980, 6,8; em 1981, 7,2; em 1982, 3,8; em 1983, 3,0 e em 1984, 4,1, para uma média geral de 5,1 casos por mês. Nos anos de 1979 a 1981 o número de casos positivos situou-se acima da média anual de 61,2 casos, e nos três anos seguintes o número de casos positivos não atingiu a média.

Os casos positivos na espécie bovina (figura 4) tiveram maior freqüência nos anos de 1984 (com 240 casos) e 1983 (com 155 casos). A média mensal de casos em bovinos em 1979 foi 2,8; em 1980, 3,8; em 1981, 2,7; em 1982, 2,6; em 1983, 12,9 e em 1984, 20,0, dando uma média geral de 7,5 casos por mês.

Os casos positivos em felinos (figura 5) foram mais freqüentes em 1980, com 13 casos, e nos demais anos a distribuição se apresentou em torno da média de 6,8 casos por ano.

A raiva em outras espécies apresentou uma freqüência média de quatro casos por ano (figura 6).

Os resultados obtidos com os três métodos de diagnóstico (Seller, imunofluorescência e inoculação em camundongos), estão representados na tabela 1 cujos dados correspondem aos exames

realizados pelo laboratório do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor" durante o período.

DISCUSSÃO

A análise dos casos de raiva canina ou urbana (figura 3) permite distinguir duas situações distintas na situação da enfermidade, no concernente a casos confirmados por exame de laboratório. A primeira, no triênio 1979-1981, com um número de 235 casos. A segunda, no triênio 1982-1984, onde se diagnosticaram 135 casos positivos, pouco mais da metade do número observado no triênio anterior. É possível que o maior responsável por essa queda tenha sido o combate realizado na capital do estado, Porto Alegre, já que em 1979 e 1980 Porto Alegre fora responsável por 32,4% de casos positivos (48 de 148). Em 1981, verificou-se apenas um caso e, a partir desse ano, nenhum outro caso foi detectado (5, 6).

Também é interessante observar que a maior concentração de casos até 1982 ocorreu nos meses de inverno, notadamente junho e julho, ao passo que em 1983 e 1984 essa tendência se modificou. Ainda nesse sentido, observa-se que a crença popular de que "agosto é o mês da raiva", crença essa amplamente difundida no estado, carece de fundamentação laboratorial. No entanto há registros de que no decênio 1963-1972, os meses em que mais se observaram casos de raiva foram agosto (108), abril (107) e julho (101) (7).

A figura 2 revela que só uma baixa percentagem dos casos de suspeita de raiva canina são confirmados como tal em laboratório. Essas cifras se justificam devido à gravidade do problema de saúde pública que leva a descartar a raiva como possibilidade diagnóstica ao invés

FIGURA 3. Distribuição mensal dos casos de raiva canina e número de amostras enviadas para diagnósticos

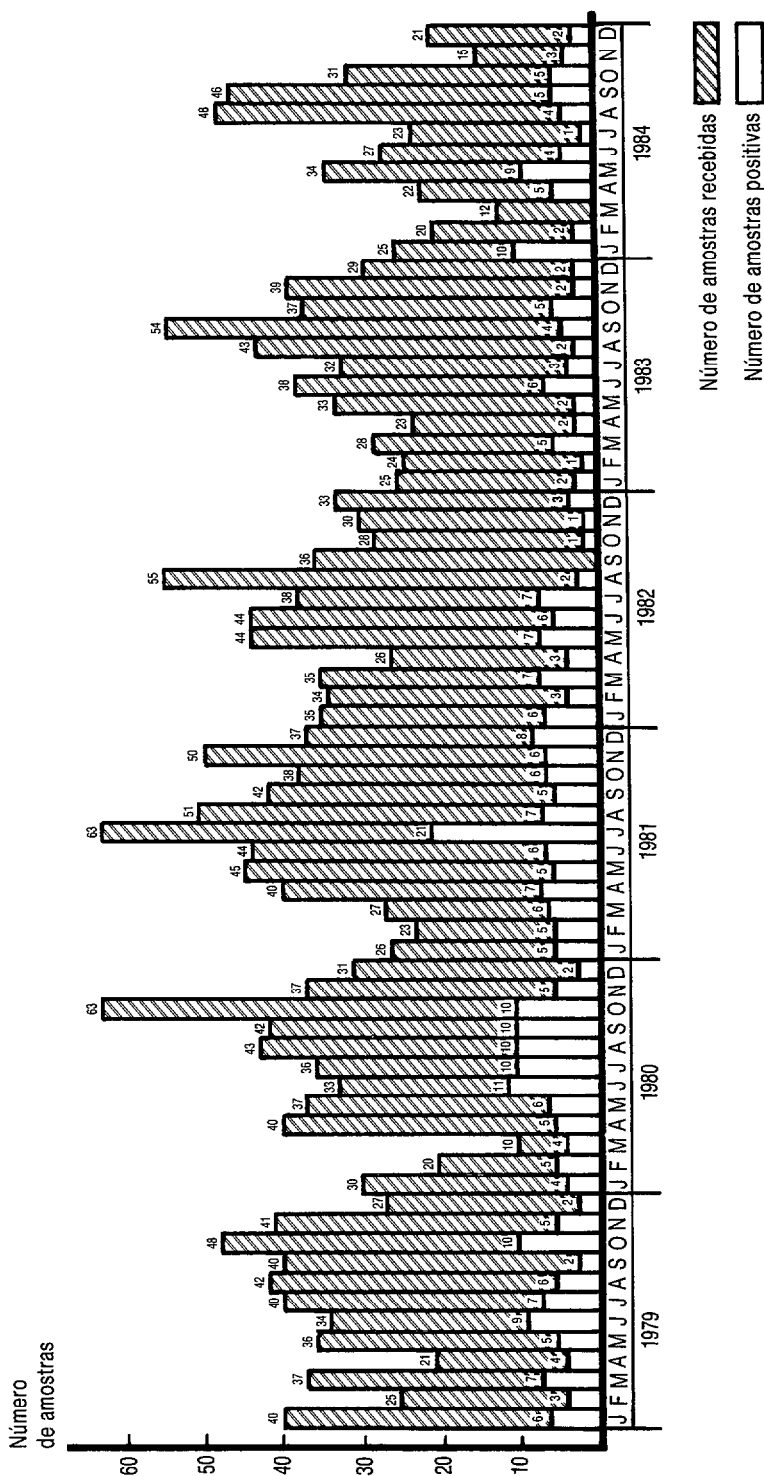
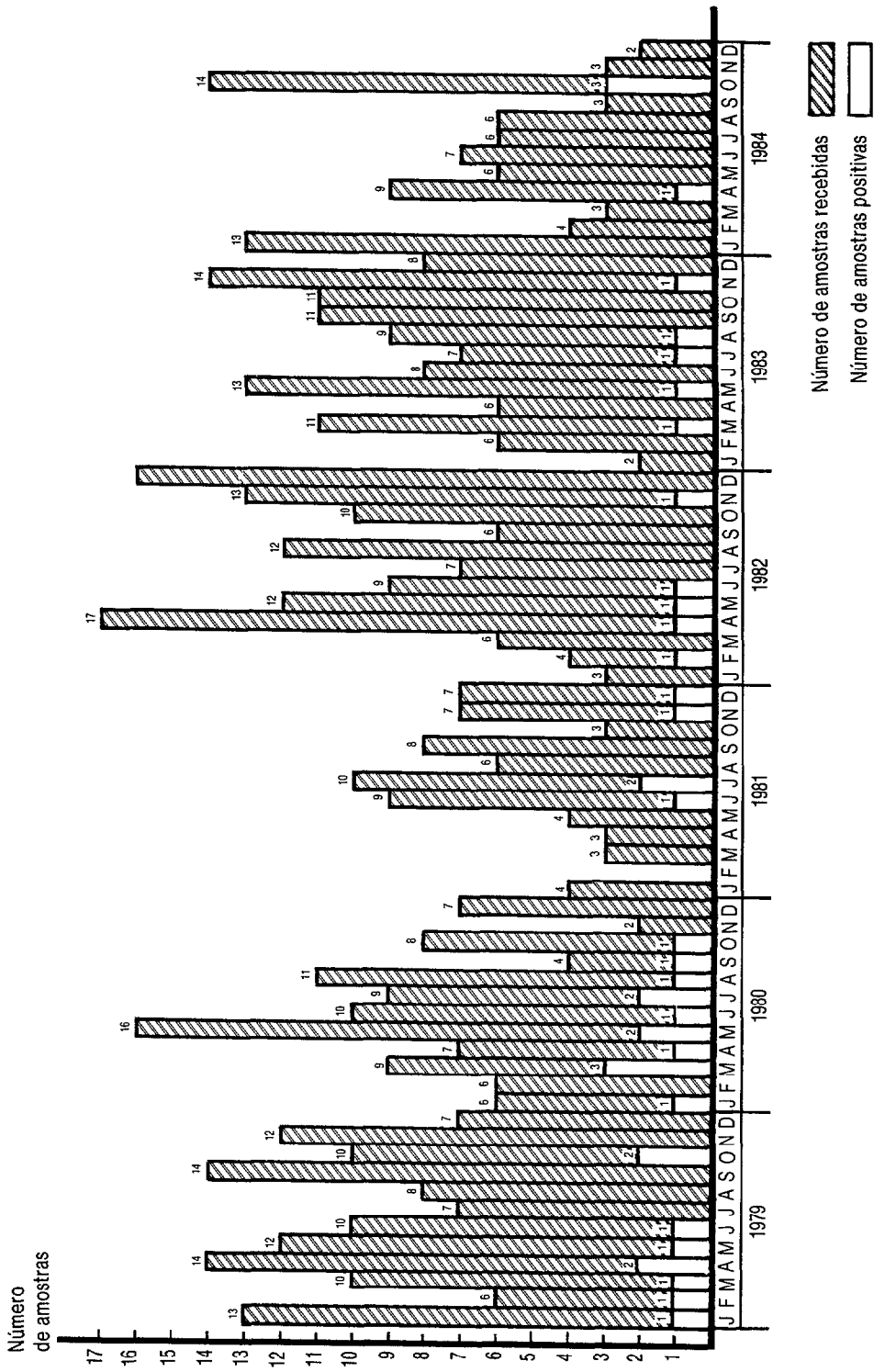


FIGURA 5. Distribuição mensal dos casos de raiva felina e número mensal de amostras enviadas para diagnósticos





 Número de amostras recebidas
 Número de amostras positivas

FIGURA 6. Distribuição mensal dos casos de raiva em outras espécies e número de amostras recebidas

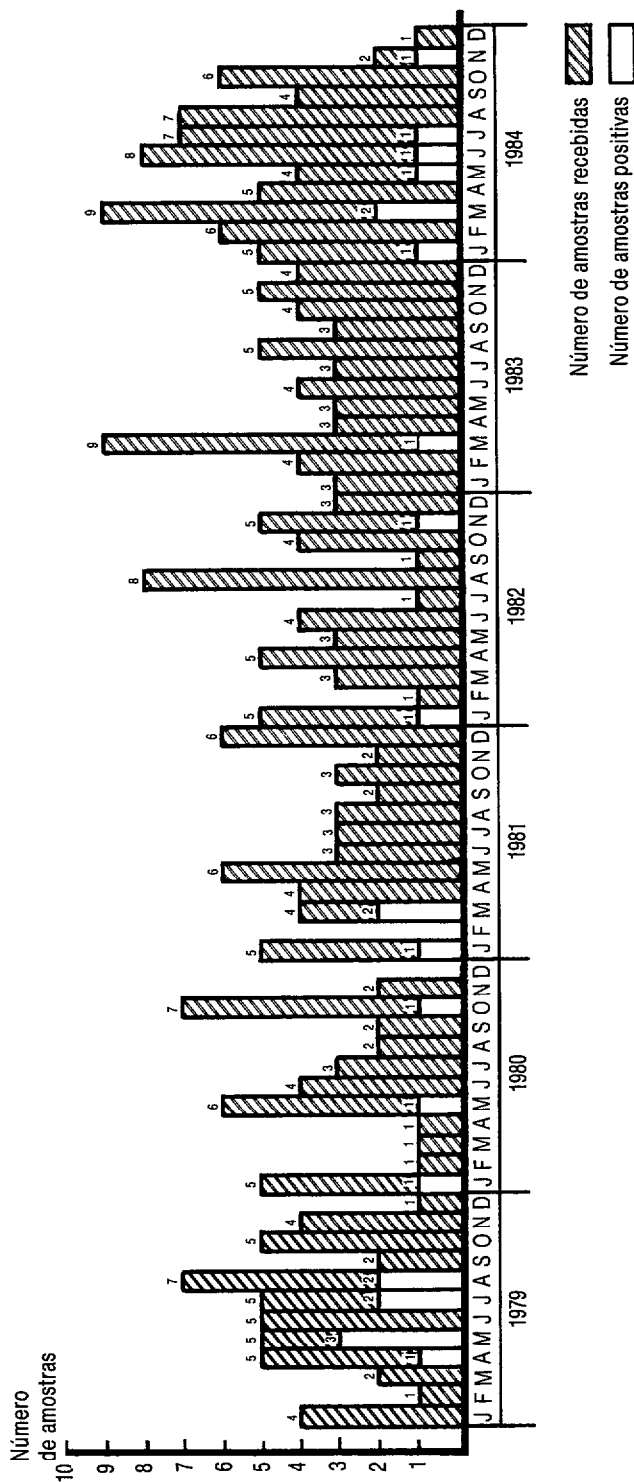


TABELA 1. Percentagens de detecção de positivos obtidas com os métodos de Sellar, imunofluorescência e inoculação em camundongos

Métodos	1979	1980	1981	1982	1983	1984	Média
SELLER	47,2	71,4	73,9	82,9	72,7	69,5	69,5
IF ^a	100,0	97,9	94,1	95,1	100,0	100,0	97,85
INOC ^b	100,0	100,0	99,1	98,8	100,0	100,0	99,6

Fonte: Laboratório de Raiva do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor".

^a IF = Imunofluorescência.

^b INOC = Inoculação em camundongos lactentes de 3 a 8 dias de idade.

de confirmar uma real suspeita da doença.

Quanto aos casos de raiva bovina (figura 4), a tendência foi praticamente inversa ao quadro observado com a raiva canina. A partir de 1983 observou-se um drástico aumento do número de casos. Na figura acham-se incluídos, também, dados referentes aos seis primeiros meses de 1985 para um melhor acompanhamento do quadro. Esse aumento reflete a epizootia desencadeada na zona serrana do estado incrementando, assim, o número de amostras enviadas ao laboratório, bem como o número de casos positivos (figura 1).

A raiva bovina tem-se apresentado de forma cíclica, manifestando-se em intervalos que variam de oito a 11 anos, conforme registros anteriores (8). No Rio Grande do Sul as epizootias registraram-se em 1944, 1956/1957 e 1964/1965. Três ciclos epidemiológicos distintos foram observados de 1956 a 1967, de 1967 a 1972 e de 1972 a 1980, com médias de 3 503, 1 020 e 500 casos por ano, respectivamente (8). Nos dados levantados no presente trabalho evidencia-se uma epizootia de proporções bem menores do que as registradas por aquele autor. Por outro lado, o número de amostras positivas em bovinos, confirmadas laboratorialmente, pode refletir muito menos fielmente o número total de casos do que o observado com a raiva canina, uma vez

que se constitui em problema mais de ordem médico-veterinária do que propriamente um problema grave de saúde pública, como é a raiva canina, pela menor exposição de indivíduos ao risco. Observa-se ainda que a percentagem de positivos, em relação ao número de amostras enviadas a laboratório, é bastante elevada, o que aparentemente representa uma menor necessidade de descarte da possibilidade de raiva como o observado em caninos. Conseqüentemente, o número real de casos pode ter sido maior do que os aqui registrados. As possíveis causas para o desencadeamento dessa epizootia serão objeto de publicação futura, embora alguns aspectos do problema já tenham sido discutidos por outro autor (9).

Os casos diagnosticados em felinos e outras espécies representaram, respectivamente, 4,2% e 2,5% dos casos positivos. A raiva em felinos teve seu quadro clínico-epizootiológico bem descrito (7) e, na situação levantada neste estudo, não difere da apresentada por aquele autor. Os casos de raiva felina representam somente um escape de vírus dos casos de raiva canina.

Também a raiva em outras espécies (afora morcegos hematófagos) não constitui problema na região, em contraste com os constatados nos Estados

Unidos da América e na Europa (9-13). Os casos em animais selvagens verificados, também podem ser incluídos na mesma situação da raiva felina, uma vez que, pelo menos até onde foi possível o rastreamento epidemiológico, eram animais tratados como animais domésticos.

Com relação à sensibilidade das técnicas diagnósticas empregadas, a inoculação em camundongos foi o parâmetro utilizado para a avaliação das demais, à exceção de dois casos, um em 1980 e outro em 1981, em que resultaram positivos à imunofluorescência e, posteriormente, não foram confirmados pela inoculação.

Há vários trabalhos publicados a respeito da sensibilidade das três técnicas (14-17). Numa dessas obras (14), em 178 casos positivos, os autores identificaram 87,6% pelo método de Seller e 90,4% por imunofluorescência, contra 99,1% de sensibilidade da inoculação. Outro autor (18), em sua revisão sobre a matéria, cita que 98% de 1 537 positivos foram identificados por imunofluorescência.

Um estudioso do laboratório do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor" (10) registrou dados sobre as amostras positivas no triênio 1970-1972, quando se detectaram 98 casos, sendo que 75,5% o foram pelo método de Seller, 79,5% por imunofluorescência e 96,0% por inoculação. Esse trabalho não incluía amostras enviadas em glicerina, Bedson ou líquido de Vallée. Posteriormente ficou constatado que trocando a fixação em acetona pela fixação em calor brando, a glicerina deixava de ser um problema para a prova de imunofluorescência, aumentando a sensibilidade do método (3).

Os resultados obtidos pelo presente estudo (tabela 1) confirmam uma confiabilidade muito alta da imunofluorescência, fato este já de conhecimento da comunidade científica, desde

que observadas certas recomendações básicas (19) e utilizado um microscópio de boa qualidade, fator este que seguramente influenciou os baixos níveis de sensibilidade obtidos anteriormente (10).

O laboratório de raiva do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor" é referência para diagnóstico da enfermidade no estado do Rio Grande do Sul (5). No final de 1979, o Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas foi oficializado como laboratório capacitado para diagnóstico de raiva. Em conjunto, os dois laboratórios respondem pela totalidade dos casos de raiva confirmados laboratorialmente. Uma boa base diagnóstica é fundamental para o sucesso de qualquer sistema de defesa sanitária e, portanto, o conhecimento dos índices de sensibilidade e especificidade obtidos devem constituir o primeiro passo para o estabelecimento de campanhas ou programas de controle ou erradicação de enfermidades. Particularmente o aspecto de saúde pública relacionado com a necessidade de vacinação de seres humanos, bem documentada na região (5), requer apoio laboratorial altamente confiável para permitir uma diminuição do número de pessoas tratadas, com conseqüente decréscimo do número de possíveis acidentes pós-vacinais (20-23).

RESUMO

Neste trabalho apresentam-se os resultados dos diagnósticos de raiva realizados pelo laboratório de raiva do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor" e do Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, no período de 1979 a 1984.

Examinaram-se, ao todo, 4 587 materiais, com uma média de 764,5 espécimes recebidos por ano. Desse total, 971 tiveram diagnóstico positivo, correspondendo a 21,2% das amostras sendo 367 caninos (8,0%), 539 bovinos (11,7%), 41 felinos (0,9%) e 24 de outras espécies (0,5%).

As técnicas utilizadas para os diagnósticos foram a pesquisa de corpúsculos de Negri, pelo método de Seller, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos. A média de detecção de positivos das três técnicas se situou em 69,5% para o método de Seller, 97,85% para a imunofluorescência e 99,6% para a inoculação em camundongos.

Apresentam-se ainda a distribuição mensal dos casos de raiva durante os seis anos de estudo, por onde se pode observar uma tendência à diminuição dos casos de raiva canina a partir de 1982 e um grande aumento de raiva bovina a partir de 1983, revelando uma alteração da situação no campo caracterizada por uma epizootia na zona serrana do estado, embora de dimensões bem menores do que as grandes epizootias observadas em anos anteriores. □

REFERÊNCIAS

- 1 Tierkel, E. S. Rapid microscopic examination for Negri bodies and preparation of specimens for biological test. In: Organização Mundial da Saúde. *Laboratory Techniques in Rabies*. 3 ed. Genebra, 1973, cap. 4, pp. 41-55.
- 2 Dean, D. J. e Abelseth, M. K. The fluorescent antibody test. In: Organização Mundial da Saúde. *Laboratory Techniques in Rabies*. 3 ed. Genebra, 1973, cap. 6, pp. 73-84.
- 3 Vidor, T. e Bauer, A. G. Diagnóstico de raiva através da imunofluorescência em materiais conservados em glicerina. *Bol Inst Pesq Vet Desidério Finamor* 4:97-101, 1977.
- 4 Atanasiu, P. Animal inoculation and the Negri body. In: Baer, G. ed. *The natural history of rabies*. Londres, Academic Press, 1975, vol. 1, cap. 19, pp. 373-400.
- 5 Konrath, R. Raiva: Qual é a situação no Estado? *Bol Saude* 10(1):15-25, setembro de 1983.
- 6 Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor". Relatório Anual, 1984.
- 7 Vaughn, J. Cat rabies. In: Baer, G. ed. *The natural history of rabies*. Londres, Academic Press, 1975, vol. 2, cap. 20, pp. 139-154.
- 8 Nunes, J. C. C., Azevedo, C. A. P. de e Rodrigues, I. Combate à raiva dos herbívoros e caninos no Rio Grande do Sul. *Lavoura/Pecuária* 21:24-27, 1982.
- 9 Acha, P. A review of rabies prevention and control in the Americas, 1970-1980. Overall status of rabies. *Bull Off Int Epiz* (1-2): 9-52, 1981.
- 10 Bauer, A. G. Apresentação no Rio Grande do Sul, da raiva canina e bovina, através de dez anos de exames laboratoriais. Anais do III Congresso Estadual da Sociedade Veterinária do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, julho, 1973, pp. 133-142.
- 11 Organização Pan-Americana da Saúde. Centro Pan-Americano de Zoonose. *Vigil Epidemiol Rab Am* 10(5), 1978.
- 12 Organização Pan-Americana da Saúde. Centro Pan-Americano de Zoonose. Informe estadístico de la rabia en las Américas. *Vigil Epidemiol Rab Am* (Supl) 12, 1980.
- 13 Organização Mundial da Saúde. *Comité de Experts de la OMS en Rabia. Sexto informe*. Genebra, 1973. Série de Relatórios Técnicos 523.
- 14 Levaditi, J. C., Atanasiu, P., Gamet, A. e Guillon, J. C. *Arch Inst Pasteur Alger*, 1971. In: Atanasiu, P. Animal inoculation and the Negri body. In: Baer, G., ed. *The natural history of rabies*. Londres, Academic Press, 1975, vol. 1, cap. 20, pp. 373-400.
- 15 Lennette, E. H., Woodie, J. D., Nakamura, K. e Magoffin, R. L. The diagnosis of rabies by fluorescent antibody method employing immune hamster serum. *Health Lab Sci* 2: 24-34, 1965.

- 16 Schneider, L. G. *Tieraerztl Umsch* 19:502-509, 1964. In: Kissling, R. E. The fluorescent antibody test in rabies. In: Baer, G. ed. *The natural history of rabies*. Londres, Academic Press, 1975, vol. 1, cap. 20, pp. 401-416.
- 17 Schneider, L. G. e Wachendorfer, G. *Berl Munch Tieraerztl Wochenschr* 77:454-458, 1964. In: Kissling, R. E. The fluorescent antibody test. In: Baer, G. ed. *The natural history of rabies*. Londres, Academic Press, 1975, vol. 1, cap. 20, pp. 401-416.
- 18 Jentsch, K. D. *Zentralbl Mikrobiol* 202:307-327, 1967. In: Kissling, R. E. The fluorescent antibody test. In: Baer, G. ed. *The natural history of rabies*. Londres, Academic Press, 1975, vol. 1, cap. 20, pp. 401-416.
- 19 Kissling, R. E. The fluorescent antibody test. In: Baer, G. ed. *The natural history of rabies*. Londres, Academic Press, 1975, vol. 1, cap. 20, pp. 401-416.
- 20 Toro, C., Vergara, J. e Roman, G. Neuroparalytic accidents of antirabies vaccination with suckling mouse brain vaccine. Clinical and pathologic study of 21 cases. *Arch Neurol* 34(11):694-700, 1977.
- 21 Bell, J. F e Moore, J. F Allergic encephalitis, rabies antibodies, and the blood/brain barrier. *J Lab Clin Med* 4:5-11, 1979.
- 22 Larghi, O. P., Varela-Diaz, V. M., Sato, E., Imas, B., Cuba-Caparo, A. e Fuenzalida, E. Laboratory investigations on neuroparalytic accidents associated with suckling mouse brain vaccine. *Ann Microbiol Inst Pasteur* 177B:567-62, 1976.
- 23 Organização Pan-Americana da Saúde. Centro Pan-Americano de Zoonose. *Vigil Epidemiol Rab Am* 8(3), 1976.

SUMMARY

LABORATORY DIAGNOSIS OF RABIES IN RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

This paper presents the results of rabies diagnoses made at the rabies laboratory of the Desidério Finamor Institute of Veterinary Research and the Regional Diagnosis Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of Pelotas Federal University from 1979 to 1984.

Altogether 4 587 samples were examined, or an average of 764.5 specimens per year. Of that total, 971, or 21.2%, tested positive: 367 (8.0%) from canines, 539 (11.7%) from cattle, 41 (0.9%) from felines, and 24 (0.5%) from other species.

The techniques used in the diagnoses were examination for Negri bodies by Seller's technique, direct immunofluores-

cence, and mouse inoculation. The detection of positives in the three techniques averaged 69.5% by Seller's technique, 97.85% by immunofluorescence, and 99.6% by mouse inoculation.

The authors then present the monthly distribution of rabies cases over the six years considered, which shows a downward tendency of canine rabies starting in 1982 and a great increase in bovine rabies starting in 1983, revealing a shift of the situation in the field characterized by an epizootic in the highlands of the state, although on a much smaller scale than the major epizootics of former years.