

Novembro, 2007 Volume 4 Número 47

Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A)
*Patterning and appliance of virus isolation techniques in mice neuroblastoma cells (N2A)*Juliana Galera Castilho¹; Keila Iamamoto¹; Jonas Yoshitaka de Oliveira Lima¹; Karin Corrêa Scheffer¹; Pedro Carnieli Junior¹; Rafael de Novaes de Oliveira¹; Carla Isabel Macedo¹; Samira Maria Achkar¹; Maria Luiza Carrieri¹; Ivanete Kotait¹¹Instituto Pasteur de São Paulo, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde – IAL/CCD/SES-SP**Resumo**

O diagnóstico laboratorial da raiva é de suma importância para o controle e prevenção da doença, uma vez que os diagnósticos clínicos não são precisos. A imunofluorescência direta (IFD) é o teste mais utilizado e mesmo sendo altamente sensível, acurado e relativamente rápido, pode gerar resultados falsos negativos. Desta forma, recomenda-se o isolamento do vírus da raiva em camundongos (IVC) em amostras de Sistema Nervoso Central (SNC) de animais suspeitos de estarem infectados, teste que atualmente vem sendo substituído em vários laboratórios pelo isolamento viral em cultura de células (IVCC). O objetivo do presente estudo foi comparar a sensibilidade do teste de isolamento do vírus em cultura de células de neuroblastoma de camundongos (N2A), com o teste de IVC e com a IFD, bem como avaliar os resultados obtidos na rotina de diagnóstico do Instituto Pasteur, em relação à redução de custo, tempo e trabalho. Foram analisadas 105 amostras de SNC de diferentes espécies de animais pela IFD, pelo IVC e pelo IVCC: 50 de morcegos, 32 de cães, 13 de raposas e 10 de bovinos. Todas as amostras de morcegos e de bovinos apresentaram resultados concordantes para os três testes, enquanto que as de cães e raposas apresentaram concordância em somente 24 amostras (69%). Com base nestes resultados, a partir de 2004 estabeleceu-se que todas as amostras de morcegos enviadas ao Laboratório do Instituto Pasteur, após o diagnóstico por IFD, seriam submetidas ao IVCC, substituindo o uso de camundongos. No período de janeiro de 2004 a setembro de 2007, foram analisadas 11.298 amostras de morcegos. Um total de 67 amostras positivas por IFD e/ou IVCC foram também submetidas ao IVC e 61 amostras apresentaram resultados concordantes nos três testes, mostrando que o uso de células N2A é mais sensível para o isolamento de “vírus de rua” em uma rotina laboratorial para amostras de morcegos, sendo rápido e de menor custo do que o IVC.

Palavras-chave: raiva, cultura celular, neuroblastoma murino, morcegos**Abstract**

Rabies laboratorial diagnosis is very important since clinical diagnosis is not precise. Fluorescent Antibody Test (FAT) is the most used test and even though it is highly sensible, accurate and fast, false negatives results may occur. Thus, the isolation of rabies virus in mice (VIM) of Central Nervous System (CNS) samples of suspected animals to be infected is also recommended and, nowadays, this test has been substituted in many laboratories by viral isolation in cell culture (VICC). The aim of the present study was to compare the sensibility of virus isolation in murine neuroblastoma (N2A) cell culture with VIM test and with FAT, as well as evaluate obtained results in the diagnostic routine from Pasteur Institute, regarding reduction of costs, time and work. A total of 105 CNS samples of different animal species were analyzed by FAT, VIM and VICC: 50 bats, 32 dogs, 13 foxes and 10 bovines. All bats and bovines samples presented concordant results for the three tests, while dogs and foxes samples presented concordance only in 24 samples (69%). Based on these results, since 2004 it has been instituted that all bat samples sent to Pasteur Institute Laboratory, after diagnosed by FAT, should be submitted to viral isolation in cell culture, replacing the use of

mice. In the period of January 2004 to September 2007, 11.298 bat samples were analyzed. A total of 67 positive samples for IFD and/or VICC were also submitted to VIM, and 61 samples presented concordant results for the three tests, and showed that the use of N2A cells is more sensible to "street virus" isolation of bat samples in laboratorial routine, being faster and lower in costs than VIM.

Key words: rabies, cell culture, murine neuroblastoma, bats

Introdução

A raiva é uma encefalite viral causada por um *Lyssavirus*, que continua sendo de grande importância na saúde pública, pelo elevado número de óbitos que ocasiona, especialmente nos países do continente Africano e Asiático, estimados em 55.000 óbitos/ano. O vírus da raiva apresenta intenso neurotropismo e após percorrer um caminho centrípeto, em direção ao sistema nervoso central (SNC), e sua intensa replicação nesse local, se distribui de maneira centrífuga para muitos órgãos do corpo, onde é capaz de se replicar eficientemente. Este fato explica porque o vírus da raiva pode ser cultivado em uma ampla variedade de linhagens celulares, sendo esse cultivo importante, não somente para estudos relativos à replicação viral e para a obtenção de antígenos destinados à produção de vacinas¹, mas também para utilização no diagnóstico laboratorial².

A função do laboratório de diagnóstico da raiva é de fundamental importância, pois seus resultados influenciam tanto na decisão de se instituir um tratamento profilático como, também, para adoção de medidas de controle em epizootias³.

A Organização Mundial da Saúde preconiza a imunofluorescência direta (IFD) como o teste de diagnóstico para a identificação do vírus da raiva, sendo este um teste altamente sensível, acurado e relativamente rápido, desenvolvido por Goldwasser e Kissling em 1958³. Entretanto, o isolamento do vírus por inoculação intracerebral em camundongos é também recomendado para a confirmação do diagnóstico pela IFD. Isto porque o isolamento do vírus por inoculação intracerebral em camundongos detecta vírus em amostras com baixa concentração viral, que pode gerar resultados falsos negativos na IFD⁴. A técnica de isolamento viral em camundongos (IVC), apesar de apresentar uma alta sensibilidade, pode demorar até 30 dias para obtenção do resultado, e é possível somente quando há o contínuo fornecimento de animais, sendo, porém, de grande importância epidemiológica e acadêmica⁵. Por outro lado, o vírus da raiva pode ser cultivado em células, e em muitos laboratórios o IVC tem sido substituído pelo isolamento viral em cultura de células (IVCC), sendo este último um método relativamente fácil, barato e com redução de tempo para a obtenção dos resultados².

O uso de linhagens celulares para o cultivo do vírus da raiva foi primeiramente descrito em 1913, por Levaditi⁶. Entretanto, pensava-se que as amostras de "vírus de rua" adaptavam-se lentamente ao cultivo em células e desta forma, esse procedimento não foi adotado na rotina laboratorial de diagnóstico⁴. Na década de 70, as linhagens celulares BHK-21, CER e neuroblastoma de camundongo (N2A) foram identificadas como sistemas apropriados para o isolamento de "vírus de rua"^{7,8,9}. Atualmente, os estudos indicam que a célula N2A é a mais susceptível à infecção pelo vírus da raiva^{10,11,12,13}.

O objetivo desse trabalho foi comparar a sensibilidade dos testes de isolamento do vírus da raiva em cultura de células (N2A), com o isolamento em camundongos e com a IFD, como também analisar os resultados obtidos na substituição do IVC pelo IVCC, na rotina do Laboratório de Diagnóstico do Instituto Pasteur, em relação ao custo, tempo e trabalho.

Material e métodos

Amostras

Para a comparação entre as técnicas de diagnóstico foram analisadas 105 amostras de SNC de diferentes espécies animais já diagnosticadas por IFD e IVC: 50 de morcegos, 32 de cães, 13 de raposas e 10 de bovinos. As amostras de morcegos foram coletadas entre junho e dezembro de 2003, em vários municípios do Estado de São Paulo. As amostras de cães e raposas foram coletadas em 2005 e 2007 nos Estados do Pará, Maranhão e Pernambuco e as amostras de bovinos foram provenientes de vários municípios do Estado de São Paulo e Minas Gerais no ano de 2007.

Para avaliar a eficiência da técnica de IVCC, na rotina do Laboratório de Diagnóstico do Instituto Pasteur, foram diagnosticadas 11.278 amostras de morcegos. Essas amostras foram inicialmente diagnosticadas por

IFD seguida pelo IVCC e coletadas, na sua maioria, em municípios do Estado de São Paulo, durante o período de 2004 a outubro de 2007, sendo: 2004 (2.219), 2005 (3.986), 2006 (3.466) e 2007 (1.607).

Imunofluorescência Direta (IFD)

Foram preparadas lâminas a partir do SNC de todas as amostras e submetidas à IFD, como descrito por Dean *et al.* (1996)¹⁴. A reação foi revelada com conjugado anti-rábico policlonal antinucleocapsídeo, produzido com soro hiperimune de coelho pelo Instituto Pasteur de São Paulo. As lâminas foram examinadas em microscópio de epi-iluminação de fluorescência, juntamente com controles positivo e negativo, assegurando o controle da qualidade do teste.

Isolamento Viral em Camundongos (IVC)

Uma suspensão a 20% (peso/volume) foi preparada a partir de SNC das 105 amostras de diferentes espécies animais e das 67 amostras de morcegos positivas pelo IVCC coletadas no período de 2004 a 2007. Cada uma das suspensões foi inoculada por via intracerebral em sete camundongos albinos suíços de 21 dias, com peso entre 11 e 14g, de acordo com a técnica preconizada por Koprowski (1996)¹⁵.

Isolamento Viral em Cultivo Celular (IVCC)

O isolamento *in vitro* do vírus em culturas celulares foi realizado em microplacas com 96 poços, seguindo o protocolo descrito por Webster e Casey (1996)², com adaptações realizadas no Instituto Pasteur. A suspensão foi a mesma utilizada para o isolamento viral em camundongos, que foi diluída em Meio Mínimo Essencial (MEM) (Sigma, cat. n° M0268), suplementado com 10% de soro fetal bovino e com células de neuroblastoma de camundongo, adquiridas da *American Type Culture Collection, Rockville, Md.* (ATTC), e diluídas em MEM (suplementada com 0,3mM de aminoácidos não essenciais e Gentamicina). As células foram utilizadas em uma concentração de aproximadamente 5×10^5 células/mL, resultando em uma suspensão cerebral final de 4%. Cada suspensão foi inoculada em triplicata nas placas e foram utilizados controles positivos e negativos para garantir a qualidade interna. As placas contendo células foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂, 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)¹⁴, com pequenas modificações, e utilizando o conjugado anti-rábico policlonal antinucleocapsídeo, produzido com soro hiperimune de coelho, pelo Instituto Pasteur de São Paulo e, a seguir, 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. Finalizando o processo, as placas contendo células foram examinadas em microscópio invertido de fluorescência e os resultados foram assim determinados: a) resultado negativo – nenhuma célula infectada detectada por fluorescência e, b) resultado positivo - presença de uma ou mais células infectadas detectadas por fluorescência.

Resultados

Os resultados das 105 amostras de SNC testadas IVCC, coletadas no período de 2003 a 2007, foram comparados com a IFD e o IVC, sendo os dados apresentados na Tabela 1. Em relação às amostras de morcegos e bovinos, os resultados de IFD e isolamento viral tanto em cultivo celular como em camundongos foram concordantes, mas em relação às amostras de cães e raposas os resultados se mostraram variáveis para as três técnicas realizadas (Tabela 2).

Tabela 1. Resultados dos testes realizados para o diagnóstico da raiva em 105 amostras de SNC de morcegos, bovinos, cães e raposas coletadas no período de 2003 a 2007.

Espécie Animal/ período	Nº de amostras	Diagnóstico	Testes diagnósticos para Raiva					
			IFD		Isolamento em Camundongos		Isolamento em Cultivo Celular	
			P*	N*	P	N	P	N
Morcegos	50	P	20	0	20	0	20	0
(2003)		N	0	30	0	30	0	30
Bovinos	10	P	10	0	10	0	10	0
(2007)		N	0	0	0	0	0	0

Cães (2005 e 2007)	32	P	25	0	12	0	14	0
Raposas		N	0	7	0	20	0	18
	13	P	13	0	4	0	7	0
(2007)		N	0	0	0	9	0	6
Total	105		68	37	46	59	51	54

P* = Positivo; N* = Negativo

Fonte: Instituto Pasteur

Tabela 2. Resultados dos testes realizados para o diagnóstico da raiva em 45 amostras de cães e raposas.

Nº de Amostras/ Espécie	IFD	Isolamento em Camundongos	Isolamento em Cultivo Celular
13 cães e 6 raposas	+	+	+
5 cães	-	-	-
10 cães e 4 raposas	+	+	-
1 raposa	+	-	+
2 cães e 2 raposas	+	-	-
1 cão	-	+	+
1 cão	-	+	-

Fonte: Instituto Pasteur

Em relação às 11.278 amostras de SNC de morcegos processadas na rotina do Laboratório do Instituto Pasteur, foi comparado o resultado da IFD e IVCC, além do IVC para as amostras positivas pela IFD e/ou pelo IVCC.

Verificou-se uma pequena discordância em relação aos resultados obtidos pelas técnicas utilizadas na rotina do Laboratório do Instituto Pasteur no período de 2005 e 2006. Nesse período, duas amostras, uma em cada ano, foram identificadas como positivas pelo IVCC, sendo negativas pela IFD. Em seguida, foram submetidas à técnica de IVC e em ambas isolou-se vírus, mas em uma das amostras apenas um camundongo adoeceu no 13º dia pós-inoculação e, após apresentar paralisia dos membros, foi eutanasiado no 17º dia. O encéfalo desse camundongo foi submetido à técnica de IFD, para confirmação da presença de antígeno viral, tendo apresentado resultado positivo para raiva.

Nesse mesmo período, duas amostras, sendo uma em cada ano, foram positivas na IFD e no IVCC, mas foram negativas no IVC. Este mesmo perfil de resultado foi também encontrado em duas amostras testadas no período de 2007.

Discussão

A exposição ao vírus da raiva pode resultar em uma infecção fatal em humanos, caso não haja, em tempo hábil, a adoção de medidas específicas de controle como a vacinação e a soro-vacinação pós-exposição. A decisão para o esquema de vacinação a ser utilizado é baseada nos resultados dos testes de detecção de antígeno viral realizada no tecido cerebral do animal agressor. A técnica de IFD tem demonstrado ser rápida e segura na rotina de diagnóstico da raiva¹⁶. O sucesso no diagnóstico da raiva com o uso da IFD tem induzido muitos laboratórios a abandonarem o uso do IVC para confirmação do resultado¹⁷. Entretanto, a experiência e testes de proficiência têm demonstrado que a IFD não é 100% confiável^{17,18}, fazendo com que os resultados desta técnica sejam confirmados pelo IVC, como é recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS)¹⁵. A importância do IVC é a capacidade em detectar o vírus da raiva em amostras com pequena concentração de vírus, situação esta que pode produzir resultados falsos negativos na IFD¹⁷. Entretanto, a desvantagem desta técnica é o longo tempo requerido para o término do diagnóstico, bem como o seu custo. Assim, a eficácia da combinação de técnicas de diagnóstico rápidas usando IFD e o IVCC tem sido explorada¹⁹.

O isolamento do vírus da raiva em cultura de célula é uma técnica que vem sendo bem desenvolvida e tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico da raiva. Em muitos laboratórios esta técnica vem substituindo o IVC. O IVCC é relativamente fácil de realizar, com um custo aproximado cinco vezes menor que o IVC e, o mais importante, reduz consideravelmente o tempo necessário para a obtenção dos resultados, que podem

ser obtidos em quatro dias, enquanto que o IVC pode necessitar até 30 dias para ser concluído².

Para uma técnica ser aceita como um teste de diagnóstico, sua sensibilidade deve ser comparada com testes já estabelecidos. Numerosas comparações têm sido realizadas entre a IFD, o isolamento viral em camundongos e o cultivo celular. Os resultados desses estudos indicaram que o IVCC é no mínimo tão sensível quanto o IVC, em relação à demonstração da replicação do vírus presente no tecido animal ou humano^{17,19,20}.

Estudos comparativos também indicam que a célula N2A apresenta uma sensibilidade superior em relação às outras linhagens celulares^{1,10,13}, permitindo que esta linhagem de células seja utilizada com segurança em uma rotina laboratorial para o isolamento de "vírus de rua"¹⁰.

No presente estudo, a linhagem celular N2A foi utilizada com sucesso. Das 105 amostras testadas, os resultados de 60 amostras (50 de morcegos e 10 de bovinos) foram concordantes em relação aos três testes realizados: IFD, IVC e IVCC (Tabela 1). Essas 60 amostras, enviadas ao laboratório para a continuidade do Programa de Vigilância da Raiva no Estado de São Paulo, foram diagnosticadas pelas três técnicas após seu recebimento.

O IVCC para as amostras de bovinos se mostrou bastante eficiente quando comparada com os outros testes de diagnósticos realizado (Tabela 1). Para cada uma destas amostras foram preparados inóculos de diferentes fragmentos do SNC: tronco encefálico, córtex, corno de Amon, cerebelo e um *pool* de todas essas estruturas. O vírus foi isolado através da técnica de cultivo celular em todas as estruturas, mas aquela que apresentou maior número de células infectadas foi o tronco encefálico, enquanto que o córtex apresentou menor número.

Isso nos leva a concluir que o tronco encefálico é o fragmento de eleição em amostras de bovinos para o teste de isolamento viral em cultivo celular. Em uma pesquisa desenvolvida utilizando amostras de eqüinos diagnosticadas por IFD e IVC, observou-se resultado semelhante: uma concentração maior de antígenos virais foi detectada no tronco encefálico e em tecidos de medula cervical²¹.

Em função da concordância dos resultados para os três testes de diagnóstico realizados em amostras de morcegos, além da grande quantidade de amostras dessa espécie que chega ao laboratório para a vigilância passiva, foi estabelecida como rotina laboratorial do Instituto Pasteur a associação das técnicas de IFD e o IVCC, substituindo, assim, o IVC.

Fatores relacionados às interferências ou mesmo à destruição do ecossistema natural dos morcegos, e o fato de estes animais serem extremamente versáteis à adaptação a novos ambientes (que hoje, oferecem condições especiais para sua sobrevivência, tais como alimentos e abrigos), fizeram com que eles adquirissem hábitos sinantrópicos, como um processo adaptativo, podendo ser encontrados com grande freqüência em áreas urbanas²².

Desta forma, muitos municípios têm realizado uma Vigilância Epidemiológica eficiente, o que faz com que o laboratório receba um grande número desses animais. Dentre as medidas de Vigilância Epidemiológica, há a recomendação de envio, ao laboratório de diagnósticos, de morcegos que são encontrados fora de seu hábitat natural e em condições atípicas, como os morcegos encontrados no chão e à luz do dia²³.

Em relação às 45 amostras de cães e raposas, apenas 24 apresentaram resultados concordantes para os três testes (sendo 19 positivos e 5 negativos) e 14 amostras positivas por IFD e IVC foram negativas no teste de IVCC. Isso pode ser atribuído ao fato de essas amostras terem sido diagnosticadas, primeiramente, em laboratórios da região Norte e Nordeste do país, sendo encaminhadas apenas fragmentos ao Instituto Pasteur (considerado Laboratório de Referência Nacional para Raiva) para estudos antigênicos e genéticos e, portanto, são amostras que foram submetidas a sucessivos congelamentos e descongelamentos. Sete amostras de cães e raposas apresentaram resultados não concordantes em relação aos três testes realizados (Tabela 2).

A principal razão para alteração da sensibilidade da IFD é o estado de conservação da amostra de tecido cerebral. Decomposição, ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, exposição a agentes químicos podem reduzir a sensibilidade do teste²⁴.

Os resultados das amostras de canídeos para os três testes realizados mostraram variações em relação à

revelaram que a variante de vírus da raiva classicamente associada à raiva canina não tem sido detectada no Estado desde março de 1998^{25,26}. Este fato que não permite uma melhor análise da sensibilidade em relação ao isolamento viral em camundongos e em cultivo celular, em virtude do pequeno número de amostras positivas que vem sendo analisado.

A partir do ano de 2004 foi estabelecido, diante dos resultados apresentados, que todas as amostras de morcegos enviadas ao Laboratório do Instituto Pasteur seriam, depois de diagnosticadas por IFD, submetidas ao IVCC, substituindo o uso de camundongos, com grandes ganhos econômicos e éticos, diminuindo sensivelmente o uso de animais de laboratórios.

No período de janeiro de 2004 a outubro de 2007, 11.298 amostras foram diagnosticadas por IFD seguida do IVCC. As 67 amostras positivas por IFD e/ou IVCC foram também submetidas à técnica de IVC, e destas 61 amostras apresentaram resultados concordantes para os três testes realizados. Duas amostras que foram diagnosticadas negativas por IFD apresentaram resultados positivos por IVCC. Essas duas amostras foram submetidas ao IVC e apresentaram resultados positivos, resultado este confirmado pela técnica de IFD.

A IFD tem por finalidade identificar a presença de vírus em amostras suspeitas, assim, o resultado negativo da amostra em estudo pode ser atribuído à baixa concentração viral no fragmento analisado, pois se sabe que a distribuição do vírus no SNC não é homogênea²⁷. Uma hipótese para explicar a baixa concentração viral no SNC pode ser o fato de o animal em questão ter sido capturado no início da doença. No caso da tentativa do isolamento viral, de amostras provenientes de morcegos, é usado todo o SNC, o que pode explicar a positividade para ambas as técnicas de isolamento em relação à IFD.

Quatro amostras, entre seis que não apresentaram resultados concordantes, foram positivas na IFD e no IVCC, mas apresentaram resultados negativos no IVC. Esse resultado é concordante com um estudo realizado por Webster (1987)²⁰, o qual trabalhando com inóculos contendo pequena concentração viral demonstrou a presença de vírus em somente 50% quando utilizou camundongos, enquanto que no cultivo celular isolou vírus em 99% dos mesmos inóculos.

A inoculação em camundongos, via intracerebral, é um teste biológico sensível para a replicação do vírus da raiva e mesmo quando há baixa concentração de vírus na amostra o teste pode revelar positividade. Entretanto, em outras espécies, resultados discordantes entre a IFD e a inoculação em camundongos já foram observados, principalmente em eqüinos^{21,28}.

O isolamento do vírus fornece, não somente um diagnóstico da raiva, mas também se faz necessário para obtenção de antígenos necessários à caracterização do "vírus de rua", indispensável para estudos de Epidemiologia Molecular.

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o uso de células de neuroblastoma de camundongos é sensível para o isolamento de "vírus de rua" em uma rotina laboratorial para amostras de morcegos. O isolamento do vírus através de cultivo celular oferece uma alternativa que tem se mostrado bastante sensível, rápida e economicamente vantajosa em relação ao isolamento viral em camundongos e esta de acordo com os padrões éticos atualmente exigidos para as atividades laboratoriais de pesquisa e de prestação de serviços.

Referências bibliográficas

1. King AA. Cell culture of rabies virus. *In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies 1996*. Geneva: World Health Organization. p. 114-130.
2. Webster WA, Casey GA. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. *In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies 1996* Geneva: World Health Organization. p. 96-104
3. Goldwasser RA, Kissling RE. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies vaccine antigens. **Proc Soc Exp Biol Med**. 1958; 98: 219-223.
4. Meslin F-X, Kaplan MM. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. *In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies 1996*. Geneva: World Health Organization. p. 9-27.
5. Chhabra M, Mittal V, Jaiswal R, Malik S, Gupta M, Lal S. Development and evaluation of an *in vitro* isolation of street rabies virus in mouse neuroblastoma cells as compared to conventional tests used for diagnosis of rabies. **Ind J of Med Microbiol**. 2007; 25: 263-266.
6. Levaditi MC. Virus rabique et culture des cellules in vitro. **C R Soc Biol**. 1913; 75: 505.
7. Larghi OP, Nebel AE, Lazaro L, Savy VL. Sensitivity of BHK-21 cells supplemented with diethylamino ethyl-dextran for detection of street rabies virus in saliva simples. **J Clin Microbiol**. 1975; 1: 243-245.
8. Smith AL, Tignor GH, Emmons RW, Woodie JD. Isolation of field rabies virus strains in CER and murine neuroblastoma cell cultures. **Intervirolgy** 1978; 9: 359-361.
9. Smith AL, Tignor GH, Mifini K, Motohaski T. Isolation and assay of rabies sero group viruses in CER cells. **Intervirolgy** 1977; 8: 92-99.
10. Rudd RJ e Trimarchi CV. Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus. **J Clin Microbiol**. 1987; 25: 1456-1458.
11. Tsiang H. An in vitro study of rabies pathogenesis. **Bull Inst Pasteur** 1985; 83: 41-56.
12. Tsiang H, Koulakoff A, Bizzini B, Berwald-Nether Y. J. **Neuropathol Exp Neurol**. 1983; 42: 439-452.
13. Umoh JU, Blendon DC. Comparasion of primary skunk brain and kidney and raccoon kidney cells with established cell lines for isolation and propagation of street rabies virus. **Infect Immun**. 1983; 41: 1370-1372.
14. Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P. Fluorescent antibody test. *In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies 1996*. Geneva: World Health Organization. p. 88-95
15. Koprowski, H. The mouse inoculation test. *In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies 1996* Geneva; World Health Organization. p. 80-87.
16. Dean DJ, Abelseth MK. The fluorescent antibody test. *In: Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies 1973* Geneva, World Health Organization. p. 73-83
17. Rudd RJ, Trimarchi CV. Development and Evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. **J Clin Microbiol**. 1989; 27: 2522-28.
18. Chhabra M, Bhardwaj M, Ichhpujani RL, Lal S. Comparative evaluation of commonly used laboratory test for post mortem diagnosis of rabies. **Ind J Path Microbiol**. 2005; 48: 190-93.
19. Chitra L, Pandit V, Kalyanaraman VR. Use of murine neuroblastoma culture in rapid diagnosis of rabies. **Ind J Med Res**. 1988; 87: 113-16.
20. Webster WA. A tissue-culture infection test in routine rabies diagnosis. **Can J Vet Rec**. 1987; 87: 113-16.
21. Carrieri ML, Peixoto ZM, Paciência ML, Kotait I, Germano PM. Laboratory diagnosis of equine rabies and its implications for human post exposure prophylaxis. **J Virol Methods** 2006; 138: 1-9.
22. Kotait I *et al*. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista** 2007; 4: 1-8.
23. Kotait I. Programa de prevenção e controle da raiva transmitida por morcegos em áreas urbanas. **Boletim Epidemiológico Paulista** 2006; 3 (36): *on line*.
24. Trimarchi CV, Nadin Davis SA. Diagnostic Evaluation. *In: Jackson AC, Wunner WH. Rabies*. San Diego, CA, USA. 2ed. p. 411-462.
25. Carrieri *et al*. *Desmodus rotundus* como transmissor da raiva canina e felina no Estado de São Paulo. *In: Seminário Internacional de Raiva, 2000 ago; São Paulo: Anais*. p.42.
26. Carrieri ML, De Matos CA, Carnieli JrP, De Matos C, Favoretto SR, Kotait I. Canine and feline rabies transmitted by variant 3-*Desmodus rotundus* in the State of São Paulo, Brazil. *In: Seminário Internacional: Morcegos como transmissores da raiva. 2001 dez; São Paulo: Anais*. p.51.
27. Kotait I, Carrieri ML. Raiva. *In: Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 651-57.

28. Peixoto ZMP, Cunha EMS, Sacramento D, Souza MCM, Queiroz da Silva LH, Germano PML, Kotait I. Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. **Braz J Microbiol.** 2000; 31: 72-75.
-

Correspondência/Correspondence to:

Instituto Pasteur
Av. Paulista, 393 – Cerqueira César
CEP 01311-000 – São Paulo – Brasil
Tel.: 55 (11) 3288-0088 (Pabx) / Fax: 55 (11) 3289-0831
E-mail: pasteur@pasteur.saude.sp.gov.br



Bepa
Av. Dr. Arnaldo, 351 - 1º andar, s. 135 – CEP: 01246-000
São Paulo - SP - tels.: (11) 3066-8823 / 3066-8825
e-mail: bepa@saude.sp.gov.br

