










Artigo original

# Evolução do diagnóstico virológico de raiva humana no Instituto Pasteur de São Paulo, Brasil (1970-2020): análise de dados

Evolution of the virological diagnosis of human rabies at the Pasteur Institute of São Paulo, Brazil (1970-2020): data analysis

Stefani Ferreira Rodrigues dos Santos<sup>[1]</sup>, Carla Isabel Macedo<sup>[1]</sup>,  
Juliana Galera Castilho<sup>[2]</sup>, Karin Correa Scheffer<sup>[1]</sup>, Enio Mori<sup>[1]</sup>,  
Micheli Cochi<sup>[1]</sup>, Graciane Maria Medeiros Caporale<sup>[1]</sup>, Helena Beatriz de  
Carvalho Ruthner Batista<sup>[1]</sup>, Samira Achkar<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Secretaria de Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, Instituto Pasteur, São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>[2]</sup>Secretaria de Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, Instituto Adolfo Lutz, Araçatuba, São Paulo, Brasil

## Autor para correspondência

Samira Achkar

E-mail: smachkar@pasteur.saude.sp.gov.br

Instituição: Instituto Pasteur (IP)

Endereço: Av. Paulista 393, Cerqueira César. CEP. 01311-090. São Paulo, São Paulo, Brasil.

## Como citar

Santos SFR, Macedo CI, Castilho JG, Scheffer KC, Mori E, Cochi M, Caporale GMM, Batista HBCR, Achkar S. Evolução do diagnóstico virológico de raiva humana no Instituto Pasteur de São Paulo, Brasil (1970-2020): análise de dados. BEPA, Bol. epidemiol. paul. 2024; 21: e39696. doi: <https://doi.org/10.57148/bepa.2024.v.21.39696>

Primeira submissão: 04/10/2023 • Aceito para publicação: 05/02/2024 • Publicação: 11/03/2024

Editora-chefe: Regiane Cardoso de Paula

## Resumo

O diagnóstico laboratorial precoce de raiva humana deve ser realizado por testes apropriados, visto que a aplicação de protocolos de tratamento médico em indivíduos internados depende dos resultados laboratoriais. O presente estudo analisou os dados referentes aos 560 casos suspeitos de raiva humana submetidos ao diagnóstico virológico no IP-SP entre os anos de 1970 e 2020. Houve um avanço das metodologias laboratoriais, especialmente as moleculares, que passaram a ser essenciais, possibilitando o tratamento de indivíduos expostos, bem como a determinação da fonte de infecção dos casos, fato fundamental para a efetividade de ações de controle em regiões vulneráveis à disseminação da doença. Intervenções no ciclo urbano da raiva, por meio de vacinação de cães e gatos e encaminhamento de amostras para diagnóstico, diminuíram os casos transmitidos por cães, principalmente no Sudeste. Em contrapartida, no mesmo período foi observado um aumento exponencial de casos relacionados ao ciclo silvestre nas regiões Norte (32%) e Nordeste (53,3%), tendo os morcegos como principais transmissores (72%), seguidos dos primatas não humanos (6%) e dos canídeos silvestres (1%). Esses resultados demonstraram a importância do aprimoramento do diagnóstico laboratorial, que é parte essencial na condução de estratégias de controle, bem como de tratamento de indivíduos expostos.

**Palavras-chave:** raiva humana, diagnóstico laboratorial e vigilância em saúde pública.

## Abstract

Early laboratory diagnosis of human rabies should be performed by appropriate tests, since the application of medical treatment protocols in hospitalized individuals depends on laboratory results. The present study analyzed the data referring to the 560 suspected cases of human rabies submitted to virological diagnosis in the IP-SP from 1970 to 2020. There has been an advance in laboratory methodologies, especially molecular ones, which have become essential, enabling the treatment of exposed individuals, as well as allowing the determination of the source of infection of cases, a fundamental fact for the effectiveness of control actions in regions vulnerable to the spread of the disease. Interventions in the urban cycle of rabies, through vaccination of dogs and cats and referral of samples for diagnosis decreased the cases transmitted by dogs, especially in the Southeast, on the other hand, an exponential increase of cases was observed in the same period, in the North (32%) and Northeast (53.3%) regions, with cases related to the wild cycle, with bats as the main transmitters (72%), followed by non-human primates (6%), and wild canids (1%). Our results demonstrated the importance of improving laboratory diagnosis, which is an essential part of conducting control strategies as well as the treatment of exposed individuals.

**Keywords:** human rabies, laboratory diagnosis, public health surveillance.

## Introdução

A raiva é uma antropozoonose relevante em saúde pública, pois causa um quadro de encefalite aguda progressiva; assim, sua importância não se limita apenas ao número de casos mas também à alta letalidade.<sup>1</sup> Estima-se que cerca de 60 mil óbitos ocorram anualmente no mundo, dos quais 40% são crianças e adolescentes com menos de 15 anos.<sup>2</sup>

O diagnóstico laboratorial de raiva humana deve ser realizado por testes apropriados para a confirmação da suspeita clínica, que é baseada no histórico do paciente e na sintomatologia observada nos indivíduos expostos. Pacientes com sintomatologia nervosa devem ser submetidos ao diagnóstico *antemortem*, a partir de amostras de soro, líquido, saliva e biópsia da região da nuca.<sup>3</sup> Nos casos clássicos, em que a doença progride ao óbito do paciente, deve-se analisar o sistema nervoso central (SNC).<sup>4</sup>

O Instituto Pasteur de São Paulo (IP-SP) é o Laboratório de Referência Nacional para o diagnóstico da raiva no Brasil, tendo, entre suas principais atribuições, o constante aprimoramento das metodologias diagnósticas a fim de auxiliar nas ações de vigilância epidemiológica da doença. Nos casos humanos, esse aprimoramento se torna fundamental para ações no âmbito de saúde pública.

No Brasil, até 1968, as estatísticas disponíveis em relação aos dados sobre raiva humana eram restritas às cidades de São Paulo e Rio de Janeiro. A partir de 1973 foi criado o Programa Nacional de Profilaxia da Raiva (PNPR), que implementou a padronização na produção de imunobiológicos, a elaboração de normas técnicas, a ampliação do diagnóstico laboratorial por meio da criação de centros diagnósticos e a capacitação de profissionais. Essas ações foram fundamentais para que o número de casos diminuísse.<sup>5</sup>

O laboratório de diagnóstico da raiva do IP-SP realiza o diagnóstico sorológico, a partir de investigação da presença de anticorpos específicos em fluidos do paciente (soro e líquido), e o diagnóstico virológico, pela investigação da presença de antígeno do agente infeccioso em fluidos e tecidos. O esclarecimento desse ponto faz-se necessário, visto que o presente estudo analisou apenas os dados referentes ao diagnóstico virológico, contudo testes sorológicos são utilizados para esse fim, como é o caso do teste de imunofluorescência direta (IFD), considerado padrão ouro para o diagnóstico laboratorial da raiva.

A implantação da IFD ocorreu no IP-SP em 1964, iniciando uma nova etapa no diagnóstico virológico, que até então contava com metodologias histológicas, principalmente a coloração de Sellers,<sup>6</sup> que foi utilizada em paralelo à IFD até 1985.<sup>5</sup> A IFD consiste na marcação de antígenos virais por anticorpos antirrábicos ligados ao isotiocianato de fluoresceína, para posteriormente serem observados em microscópio de fluorescência.<sup>7</sup>

O isolamento viral em camundongos albinos suíços (IVC), que consiste na inoculação intracerebral de suspensões de tecido cerebral, saliva e/ou líquido cefalorraquidiano (LCR) para detectar a replicação viral,<sup>8</sup> é realizado no IP-SP concomitantemente às demais técnicas para todos os casos suspeitos de raiva humana, servindo para confirmação, bem

como para a replicação da amostra nos casos positivos. Em 2006, o isolamento viral em cultivo de células (IVCC) de neuroblastoma murino (N2A) foi implantado na instituição<sup>9</sup> como método alternativo ao uso de animais de experimentação, entretanto, especificamente em casos de humanos, ambas as metodologias de isolamento viral são aplicadas, tendo em vista que a sensibilidade é maior no IVC.

Em 1996, o IP-SP implantou a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) utilizando um painel de 8 AcMs produzidos pelo Centro de Prevenção e Controle de Doenças – CDC/EUA, que define 12 perfis antigênicos do vírus da raiva (RABV).<sup>10,11</sup> Essa metodologia foi utilizada até que o diagnóstico molecular fosse implementado na instituição, a partir de 2004, e pôde elucidar a dinâmica da circulação de diferentes variantes virais em todo o território nacional, o que foi fundamental para a aplicação de medidas de contenção da doença.

A partir de meados dos anos 2000 houve um salto na evolução do diagnóstico *antemortem* da raiva, e o IP-SP foi pioneiro na execução de metodologias moleculares para esse fim. Amostras de biópsia da região da nuca de pacientes expostos a mordeduras de morcegos hematófagos foram testadas, permitindo a detecção do ácido nucleico viral em 70% do total analisado.<sup>11</sup> Essa região é altamente inervada, e o RABV frequentemente está presente nas células neurais que circundam as bases dos folículos pilosos.

Novos estudos foram realizados na instituição ao longo dos anos para o aprimoramento das técnicas moleculares. Castilho e col.<sup>12</sup> demonstraram a eficiência de um novo protocolo de diagnóstico *antemortem* utilizando amostras de saliva e biópsia de pele da região da nuca por semi-Nested/Transcrição Reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (semi-Nest/RT-PCR), com *primers* direcionados para o gene da nucleoproteína. O RNA do RABV foi identificado em 95,2% das amostras testadas, das quais 18 eram de saliva e 3 de biópsia de pele da região da nuca.

As técnicas laboratoriais devem ser complementares, o que aumenta o êxito do diagnóstico precoce. O diagnóstico por semi-Nest/RT-PCR é considerado um teste sensível que possibilita a execução e o diagnóstico precoce da doença, permitindo a tentativa de tratamento pelo Protocolo de Milwaukee e tratamento profilático de possíveis contatos.<sup>13</sup>

O presente estudo objetivou analisar a evolução das metodologias diagnósticas empregadas no IP-SP, para o diagnóstico virológico *antemortem* e *postmortem* dos casos suspeitos de raiva humana, entre 1970 e 2020.

## Metodologia

Foram utilizados dados secundários referentes às amostras de origem humana recebidas para diagnóstico virológico da raiva no IP-SP entre 1970 e 2020, os quais estão disponíveis nos registros físicos (protocolos, dissertações, publicações) e sistemas de informação (INFORAIVA e Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL)).

Por ser um período abrangente, a qualidade das informações ficou comprometida, visto que, durante o processo de coleta de dados, não foram localizados os registros de todas as amostras processadas, principalmente as mais antigas. Os dados coletados corresponderam a dois períodos: o primeiro (1970 a 1997) referente aos casos positivos<sup>5</sup> e o segundo (1998 a 2020) referente a todos os casos suspeitos recebidos para diagnóstico.

Vale ressaltar que foi dada a denominação "diagnóstico virológico" neste estudo em referência à investigação de antígeno viral. Foram considerados diagnóstico *antemortem* todos em que alguma amostra biológica tenha sido encaminhada para diagnóstico enquanto o paciente estivesse vivo.

Os dados foram tabulados em planilha Microsoft Excel® 2016, com as variáveis: características sociodemográficas (localidade, sexo, idade do paciente) e características relacionadas ao diagnóstico (diagnóstico *antemortem* ou *postmortem*, resultados das metodologias).

Para realizar o cruzamento das informações, foram utilizados os *softwares* QGIS 3.4.9, utilizando bases cartográficas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) para a produção dos mapas, e o Microsoft Excel® 2016 para a produção de tabelas e gráficos.

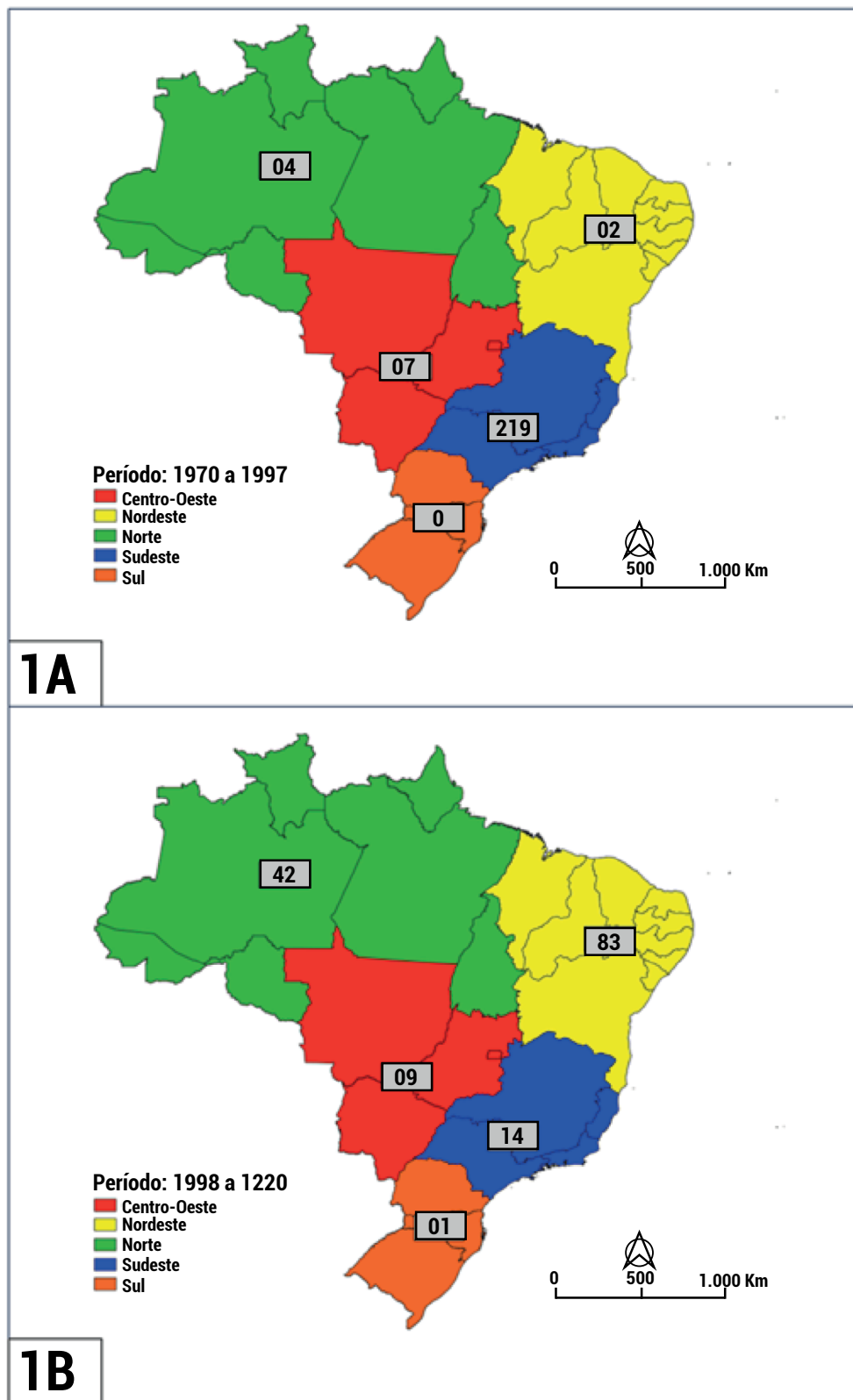
O estudo foi aprovado na Comissão Científica do Instituto Pasteur (CCIP 05/21), bem como na Plataforma Brasil (Parecer n. 5.133.604).

## Resultados

O [Mapa 1](#) demonstra a distribuição geográfica dos casos de raiva humana diagnosticados no IP-SP entre 1970 e 2020. No primeiro período (1970-1997) houve um predomínio de casos na região Sudeste, seguida das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste respectivamente. Em contrapartida, observou-se um aumento de casos nas regiões Nordeste e Norte no segundo período. Em cinco casos do primeiro período, a informação referente à localidade foi ignorada, ficando inviável a apresentação nos mapas. o [Mapa 2](#) representa os casos em cada estado e o [Gráfico 1](#), o total de casos diagnosticados.

Entre 1980 e 2003, foram notificados ao Ministério da Saúde (MS) 1.357 casos, dos quais apenas 122 (9%) foram diagnosticados no IP-SP. Entretanto, a partir da implementação das metodologias moleculares, em 2004, houve um aumento significativo dos casos notificados que foram realizados no IP-SP. 95 num total de 128 notificações, correspondendo a 73%. No ano de 2014, não houve casos no país, exceto um importado da Bolívia, que não foi notificado por se tratar de um caso não autóctone, mesmo sendo diagnosticado no IP-SP, e também não foi contabilizado neste estudo. Em 2018, um dos casos notificados não consta em nossos dados, pois apenas o soro do paciente foi encaminhado ao IP-SP – foi evidenciada a presença de anticorpos por meio do diagnóstico sorológico.

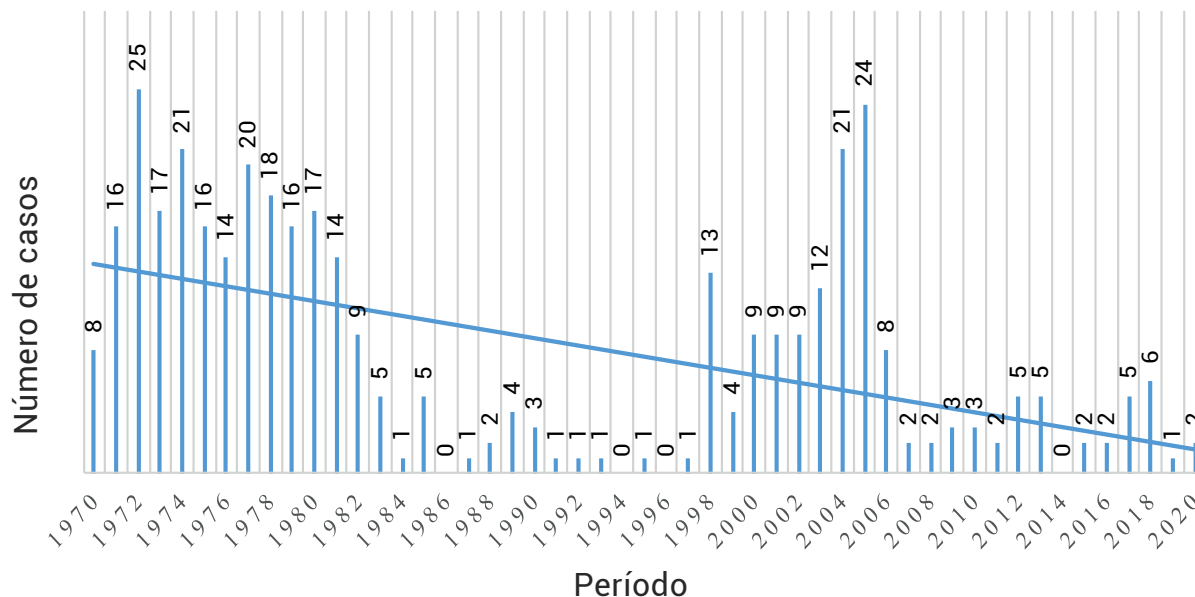
Mapa 1. Casos de raiva humana diagnosticados no IP-SP por macrorregião.



Fonte: Dados do Instituto Pasteur, 2020.



**Gráfico 1.** Casos de raiva humana diagnosticados no IP-SP (diagnóstico virológico), 1970-2020.



Fonte: Dados do Instituto Pasteur, 2020.

O tipo de diagnóstico foi analisado sob os seguintes aspectos: clínico ou laboratorial; *antemortem* ou *postmortem*. Os dados entre 1970 e 1997 contemplaram apenas os casos positivos, totalizando 237 casos com diagnóstico laboratorial, os quais foram objeto deste estudo. No período subsequente, entre 1998 e 2020, todos os casos corresponderam ao diagnóstico laboratorial ([Tabela 1](#)).

A [Tabela 2](#) demonstra os resultados da IFD e IVC segundo o tipo de amostra biológica, no primeiro período analisado, em que a IFD apresentou 95,6% de sensibilidade em amostras de SNC e apenas 34% em impressões de córnea. O IVC apresentou alta sensibilidade em todas as amostras analisadas. Observa-se um viés de informações dos dados constantes no objeto de estudo desse período.

Na [Tabela 3](#) estão registrados os resultados referentes ao segundo período, em que não foi possível calcular a sensibilidade das metodologias devido à falta de informações em relação aos resultados das demais técnicas aplicadas. No IVC, os 46 casos negativos não necessariamente refletem o resultado final do diagnóstico, ou seja, amostras positivas em outras metodologias podem não ter sido isoladas nos animais de experimentação. Duas amostras de SNC com resultado positivo na IFD foram impossibilitadas para o IVC devido ao inadequado estado de conservação.

A caracterização antigênica no IP-SP se iniciou em 1996, com a utilização do painel de anticorpos monoclonal para a realização da IFI. Foram analisadas amostras de SNC de humanos positivas para a raiva, de 1989 a 2003, das quais 5/65 apresentaram resultado incompatível com o painel de anticorpos monoclonais ([Gráfico 2](#)).



Tabela 1. Diagnóstico virológico *postmortem* e *antemortem* realizado no IP-SP, 1998-2020.

Ano	Postmortem		Antemortem		Total diagnosticado
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	
1998	16	1	0	1	18
1999	2	6	2	4	14
2000	8	1	0	4	13
2001	7	0	2	5	14
2002	08	2	1	2	13
2003	12	1	0	2	15
2004	17	0	3	2	22
2005	17	1	7	2	27
2006	3	3	4	3	13
2007	1	1	1	6	9
2008	1	0	1	12	14
2009	1	0	2	4	7
2010	0	3	3	7	13
2011	1	2	1	13	17
2012	1	0	4	4	9
2013	1	1	4	9	15
2014	0	2	0	9	11
2015	0	3	2	9	14
2016	0	2	2	2	6
2017	1	0	4	15	20
2018	0	1	6	10	17
2019	0	3	1	13	17
2020	0	0	2	3	5
<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>33</b>	<b>52</b>	<b>141</b>	<b>323</b>

Fonte: Dados do Instituto Pasteur, 2020.

**Tabela 2.** Resultados das técnicas de IFD e IVC segundo tipo de amostra biológica, 1970-1997.

Amostra	Total diagnosticado	IFD		IVC	
		Positivo	negativo	Positivo	negativo
SNC	NI	196	9	204	1
Impressões de córnea	NI	18	35	NA	NA
Saliva	NI	NA	NA	10	16

Fonte: Dados do Instituto Pasteur, 2020.

SNC: sistema nervoso central; NI: não informado; IFD: imunofluorescência direta; IVC: isolamento viral em camundongos.

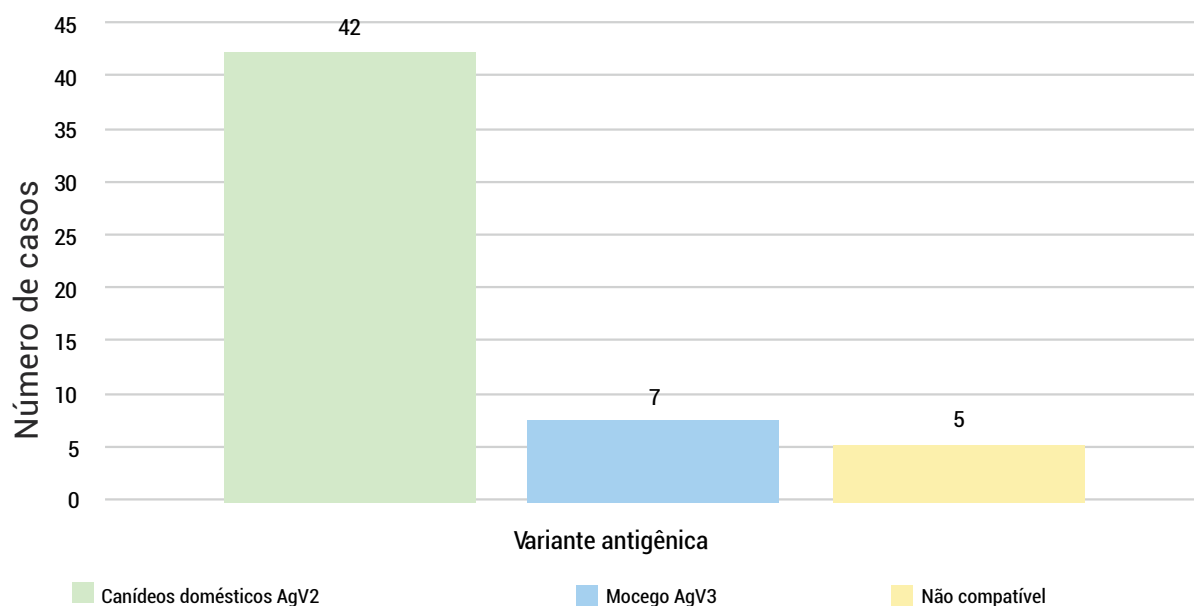
**Tabela 3.** Resultados das técnicas de IFD e IVC segundo tipo de amostra biológica, 1998-2020.

Amostra	Total diagnosticado	IFD		IVC	
		positivo	negativo	Positivo	negativo
SNC	176	130	46	128	46
Impressões de córnea	23	1	22	NA	NA
Saliva	142	NA	NA	31	101

Fonte: Dados do Instituto Pasteur, 2020.

SNC: sistema nervoso central; NA: não se aplica; IFD: imunofluorescência direta; IVC: isolamento viral em camundongos.

**Gráfico 2.** Caracterização antigênica de amostras de SNC de humanos processadas no IP-SP, no período de 1989-2003.



Fonte: Dados do Instituto Pasteur, 2020.

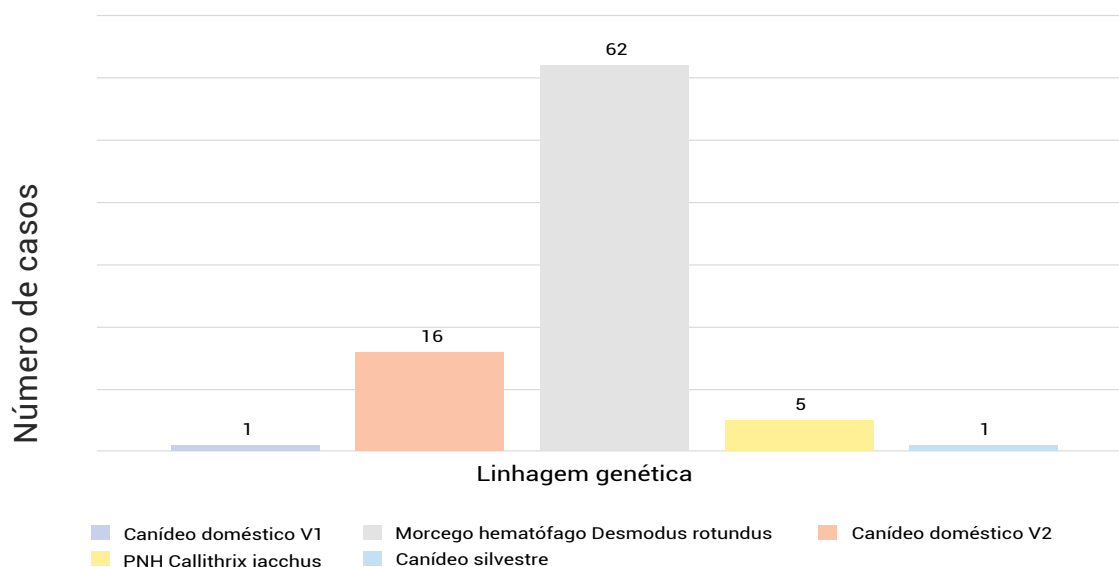
Entre 2004 e 2020, amostras de 170 pacientes internados foram submetidas ao semi-Nested/RT-PCR. Em nove casos foram coletados apenas amostras de saliva; em 12 apenas folículo piloso e em 27, apenas líquido. Nos demais, 122 casos, houve coleta de duas ou mais amostras de material biológico (saliva/folículo/líquor), dos quais 38 vieram a óbito, sendo analisado também o SNC (Tabela 4). Todas as amostras positivas foram submetidas à caracterização genética, e a maioria (62/91) correspondeu à linhagem de morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Gráfico 3). As linhagens próprias de saguis (*Callithrix jacchus*) e de canídeos silvestres apareceram majoritariamente nas regiões Norte e Nordeste; em contrapartida, linhagens circulantes em cães domésticos e em morcegos hematófagos foram observadas em amostras humanas provenientes de todas as macrorregiões do país, mesmo que em diferentes períodos. Em seis casos (6/91) não foi possível demonstrar a linhagem genética.

**Tabela 4.** Diagnóstico *antemortem* a partir da técnica de semi-Nested/RT-PCR, em diferentes amostras biológicas, 2004-2020.

Material biológico	Positivo	Negativo	Total
Apenas saliva	3	6	9
Apenas folículo	5	7	12
Apenas líquido	3	24	27
Saliva/folículo/líquor	10	75	85
Saliva/folículo/líquor/snc	26	11	37
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>123</b>	<b>170</b>

Fonte: Dados do Instituto Pasteur, 2020.

**Gráfico 3.** Caracterização genética de amostras humanas processadas no IP-SP, demonstrando a linhagem compatível de cada reservatório, 2004-2020.



Fonte: Dados do Instituto Pasteur, 2020.

## Discussão

A profilaxia correta e oportuna, que consiste em frentes multidisciplinares para o enfrentamento da doença, é fundamental para que sejam evitados novos casos de raiva humana. Nesse sentido, o papel do laboratório de diagnóstico é imprescindível, principalmente para direcionar o tratamento de indivíduos suspeitos em tempo hábil. Graças ao trabalho conjunto entre laboratório e unidades de saúde, o Brasil conta com dois casos de cura, um de Pernambuco (2008) e outro do Amazonas (2018), ambos diagnosticados no IP-SP. Amostras de saliva, folículo e líquido foram analisadas durante o período de internação dos pacientes. As duas pessoas sofreram agressão por morcegos hematófagos e foram submetidas ao tratamento pelo Protocolo do Recife, que é baseado no Protocolo de Milwaukee, com a utilização de antivirais e sedação profunda.<sup>14</sup> Simultaneamente permanecem como ações indispensáveis as campanhas de vacinação canina, a profilaxia de indivíduos com possível exposição e o monitoramento ambiental de variantes a fim de se implementar uma eficaz vigilância epidemiológica.

Países da América Latina, com o apoio da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), iniciaram, em 1983, a elaboração de estratégias de controle da raiva canina, na tentativa de erradicação da raiva humana no continente. Como resultado, pode-se observar que, de 1992 a 2003, o número de casos de raiva humana diminuiu: de 355 para 35.<sup>15</sup> No presente estudo, foi observado que, nesse mesmo período, o número de casos notificados nacionalmente passou de 59 para 17, entretanto, ao se analisarem apenas os casos diagnosticados no IP-SP, o valor sobe de 1 para 12. Provavelmente, esse aumento deve à atuação do IP-SP como laboratório de referência para diagnóstico da raiva humana a partir dos anos 1990.

Nesse sentido, houve um incentivo para que inovações tecnológicas fossem implementadas ao longo dos anos, como a produção de insumos próprios para a execução de metodologias diagnósticas, bem como a implantação de técnicas moleculares, que foram fundamentais para o avanço do diagnóstico *antemortem* em todo o território nacional.

Resultados baseados apenas em diagnóstico clínico foram observados até o ano de 1984, e posteriormente todos os casos registrados neste estudo (1985-2020) foram confirmados laboratorialmente. Vargas<sup>16</sup> analisou casos de raiva humana entre 2000 e 2017 e constatou que 79,8% dos casos foram confirmados por critérios laboratoriais.

Mudanças no armazenamento de informações acerca do diagnóstico de raiva humana no IP-SP ocorreram no decorrer dos últimos 50 anos, em que arquivos físicos foram substituídos por sistemas informatizados. A consulta de registros como fichas epidemiológicas e laudos não foi possível em nosso estudo, pois muitos não foram encontrados. Outro fator limitante observado foi a má qualidade das informações clínicas extraídas das fichas de requisição encaminhadas com as amostras, o que inviabilizou a aplicação de testes estatísticos. Carrieri e col.<sup>17</sup> relataram que a qualidade das informações

também foi muito heterogênea: dos 247 casos estudados, verificaram-se relatos dos aspectos clínicos em apenas 103 registros. Vargas<sup>16</sup> ainda se refere a limitações de viés de informação ao utilizar fontes de dados secundários em seu estudo relacionado a uma série histórica de raiva humana no Brasil.

O IP-SP foi pioneiro na implementação da técnica de IFD para diagnóstico da raiva, que começou a ser empregada no fim da década de 1960. Até 1985, o diagnóstico era realizado pela associação das três técnicas concomitantemente: coloração por Sellers, IFD e IVC. Carrieri e col. (1998) referiu a importância histórica ao método de Sellers no diagnóstico da raiva, principalmente antes do advento de anticorpos fluorescentes.<sup>5</sup> A aplicação da IFD em amostras de SNC apresentou alta sensibilidade e é recomendada até os dias atuais para o diagnóstico *postmortem*; entretanto, a IFD em impressões de córnea caiu em desuso por diversos fatores, dentre os quais: o método de coleta do material requer muita habilidade, além de ser relativamente invasivo; apresenta baixa sensibilidade diagnóstica; pode ser substituído por metodologias moleculares, que apresentam alta sensibilidade. Um estudo com 42 indivíduos com raiva obteve positividade em 41% por meio de IFD de impressões de córnea, mas o autor ressalta que foi realizado um treinamento prévio em animais, para a coleta do material.<sup>18</sup>

Para o diagnóstico de raiva humana, o IVC como técnica complementar é utilizado até a atualidade no IP-SP, mesmo com o advento das metodologias moleculares. Outros estudos demonstraram a elevada sensibilidade dessa metodologia, especialmente no diagnóstico *postmortem*.<sup>5</sup>

A caracterização antigênica por IFI foi importante entre os anos 1990 e meados dos anos 2000, pois possibilitou a caracterização de variantes circulantes no país, além de detectar perfis antigênicos incompatíveis com os estabelecidos no painel de anticorpos monoclonais utilizado no IP-SP. A partir desse ponto, diversos estudos foram desenvolvidos na instituição por meio da utilização de metodologias moleculares, o que possibilitou que tais perfis incompatíveis pudessem ser estabelecidos como novas linhagens genéticas.

A implantação de metodologias moleculares, como o semi-Nested/RT-PCR e o sequenciamento genético, foi fundamental para o êxito do diagnóstico *antemortem*, e consequentemente para a aplicação de protocolos de tratamento médico em indivíduos internados, além de permitir a determinação da fonte de infecção dos casos de raiva humana ocorridos em todo o território nacional. Além disso, a detecção do vírus em amostras em avançado estado de autólise foi possível. No presente estudo, dois casos de raiva humana foram diagnosticados a partir de amostras provenientes de indivíduos exumados.

O diagnóstico *antemortem* a partir de amostras de folículo piloso demonstrou alta sensibilidade. De 2004 a 2020, foram diagnosticados 112 casos suspeitos utilizando amostras de folículo piloso, dos quais 36 resultaram positivos (32,4%). Dados da literatura indicam que metade das biópsias de pele da região da nuca permite a detecção do vírus da

raiva na primeira semana de sinais clínicos, devido à localização do agente etiológico no folículo piloso.<sup>3</sup> Dos 112 casos, 90 foram encerrados apenas com o envio de amostras colhidas enquanto o paciente estivesse vivo, dos quais 17 resultaram positivos. Essa informação demonstra claramente a importância da coleta de folículo piloso para o diagnóstico precoce de indivíduos suspeitos, pois na grande maioria (73/90) a suspeita de raiva foi descartada, possibilitando a sobrevida do paciente.

Ao ser analisada a procedência dos casos diagnosticados no IP-SP, observou-se que os estados do Rio Grande do Sul, Amapá e o Distrito Federal não encaminharam nenhuma amostra para diagnóstico durante todo o período, porém houve casos notificados ao MS provenientes dessas localidades. O estado do Paraná encaminhou amostras, mas elas resultaram negativas para a raiva.

No primeiro período, o Sudeste foi responsável pelo diagnóstico de 97,3% do total de casos, pois a raiva em cães e gatos estava presente nos ambientes urbanos, principalmente no estado de São Paulo, aumentando o risco de agressões a humanos, que procuravam o ambulatório do instituto para receber tratamento profilático e, muitas vezes, eram encaminhados ao Hospital Emílio Ribas, na cidade de São Paulo, para isolamento. Assim, amostras de indivíduos que vinham a óbito eram encaminhadas para diagnóstico no IP-SP. A partir do segundo período, observou-se uma redução no número de casos procedentes da região Sudeste (12,6%), claramente como resultado de intervenções no ciclo da doença no meio urbano, por meio de vacinação em massa de cães e gatos, e encaminhamento de amostras suspeitas para o diagnóstico laboratorial. Em contrapartida, houve um aumento exponencial nas regiões Norte (32%) e Nordeste (53,3%), com uma frequência maior dos casos relacionados ao ciclo silvestre. Diferenças na distribuição dos casos ocorrem nas diversas regiões do país. Entre os anos 2010-2020, o Nordeste foi responsável por 52,6% (20/38) dos casos humanos registrados no Brasil, o Norte por 39,5% (15/38), o Sudeste por 2,6% (1/38), o Centro-Oeste por 2,6% (1/38) e o Sul por 2,6% (1/38).<sup>19</sup>

Foi possível estabelecer essa mudança na situação epidemiológica graças à implementação da caracterização antigênica e genética de amostras positivas realizadas no IP-SP, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, onde circulam variantes de morcegos (AgV3), saguis-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) e canídeos silvestres (AgV2\*), além da variante própria de cão doméstico (AgV2).

Apesar do aumento de casos notificados na região Norte, alguns estados apresentam particularidades que comprometem uma eficaz vigilância, como é o caso do Amapá, que registrou um único caso em 1991, mas que não está registrado em nossos arquivos. Localidades em que existe dificuldade de acesso aos serviços de saúde, muitas vezes devido às longas distâncias, bem como a inexistência de um laboratório de diagnóstico de raiva, podem ser consideradas áreas silenciosas, sobretudo em regiões com registros da doença.<sup>20</sup>

A qualidade das informações obtidas impossibilitou a análise de alguns aspectos epidemiológicos, como, por exemplo, informações sobre os animais transmissores dos casos analisados. O que se pôde observar a partir das tipificações antigênicas, no período entre 1989 e 2003, foi que cerca de 65% do total analisado resultou em variante própria de cão doméstico. A partir de 2004, com a utilização de metodologias moleculares, que possibilitaram a tipificação da totalidade de amostras recebidas para diagnóstico no IP-SP, observou-se que o envolvimento do cão doméstico correspondeu a 21%, enquanto os morcegos estavam envolvidos em 72% dos casos. No estado de São Paulo, foi registrado o último caso de raiva humana com transmissão por cão em 1997, e por morcego em 2001.

Desde a década de 1990, os morcegos hematófagos estão associados à transmissão do RABV para humanos,<sup>19</sup> em que casos ocorriam esporadicamente e, na maioria das vezes, de forma acidental. Eles ganharam grande repercussão nos anos de 2004 e 2005, período em que foram notificados 62 casos de óbito nos estados do Pará (38) e Maranhão (24).<sup>21</sup>

Atualmente observa-se a transmissão secundária, em que morcegos têm transmitido o RABV para cães e gatos, que ocasionalmente transmitem o vírus aos seres humanos. Nesse sentido, ocorreram casos nos estados de São Paulo em 2001, Paraíba em 2015, Roraima em 2016, Pernambuco em 2017 e Santa Catarina em 2019.<sup>19</sup> O aumento do envolvimento de gatos na transmissão da raiva a humanos foi observada também nos nossos resultados, com a identificação de variante de morcego hematófago *D. rotundus*, demonstrando a importância dos animais domésticos como transmissores secundários da raiva. Entre 2010 e 2020, os gatos foram responsáveis por 13% das transmissões a humanos (5/39), enquanto na década anterior a porcentagem foi de 1,9% (3/163). De forma semelhante, herbívoros foram responsáveis por óbitos humanos no período estudado, como hospedeiros acidentais na cadeia de transmissão. Foram seis casos desde 1980, um por caprino (1985), um por jumento (1992), três por bovinos (1982, 2004 e 2006) e um por cervídeo (2012).

Em 2014 foi diagnosticado no IP-SP um caso não autóctone a partir de diagnóstico *antemortem*, em que uma criança havia sido agredida por um cão na Bolívia. Em 2015, outro caso foi diagnosticado, procedente de Mato Grosso do Sul, o qual ocorreu em razão da epizootia canina nos municípios de Corumbá e Ladário, a partir da introdução de animal positivo pela fronteira com a Bolívia. O sequenciamento genético de ambos os casos confirmou ser linhagem própria do vírus isolada de cão, compatível com variante antigênica.<sup>1</sup> Essas situações reforçam a necessidade do diagnóstico laboratorial para uma efetiva vigilância epidemiológica, incluindo as regiões de fronteira, para se evitar a entrada de variantes não circulantes. Outros estudos já relataram registros de casos em regiões de fronteira no Acre, em 2000 e 2004, e em Rondônia em 2001.<sup>22</sup>

O envolvimento de canídeos silvestres e primatas não humanos correspondeu a 1% e 6%, respectivamente. Em 2020, foi registrado um caso no município de Catolé do Rocha (PB), em que uma mulher de 68 anos foi agredida por uma raposa. O número de ataques

de animais silvestres a humanos notificados em 1999 e 2005 foram, respectivamente, 35 e 16.334. Nos mesmos anos, os morcegos foram responsáveis, respectivamente, por 29 e 11.811 ataques, primatas não humanos por 5 e 3.360 e canídeos silvestres e outras espécies de menor importância epidemiológica, como gambás e guaxinins, por 1 e 1.163 ataques, respectivamente.<sup>16</sup>

Este estudo buscou contribuir para um maior entendimento da dinâmica do diagnóstico de raiva humana nos últimos 50 anos no Brasil, a partir dos casos diagnosticados no Laboratório de Referência para o Diagnóstico de Raiva e, embora apresente limitações de viés de informação, os resultados demonstraram que houve uma grande evolução no diagnóstico laboratorial da raiva humana no país, principalmente devido ao diagnóstico *antemortem*, que correspondeu a 63% do total analisado, possibilitando a aplicação de protocolos de tratamento médico em indivíduos internados; determinação da fonte de infecção dos casos de raiva humana ocorridos em todo o território nacional; bem como possibilidade de diagnóstico a partir de amostras provenientes de indivíduos exumados.

Este trabalho faz parte do projeto "Diagnóstico laboratorial de raiva humana no Instituto Pasteur no período de 1970-2020: análise de dados", que foi aprovado pela Comissão Científica sob o registro IP04/21, bem como pela Plataforma Brasil, com o parecer de número 5.133.604.

## Agradecimento

Os autores agradecem ao Instituto Pasteur de São Paulo pelo suporte financeiro, e ao Programa de Especialização Profissional em Vigilância Laboratorial da Raiva da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, pela concessão de Bolsa de estudo à aluna Stefani Rodrigues Ferreira dos Santos.



## Referências

1. Carnieli Jr. P, Castilho JG, Fahl WO, Vêras NMC, Timenetsky MCST. Genetic characterization of Rabies virus isolated from cattle between 1997 and 2002 in epizootic area in the state of São Paulo, Brazil. *Virus Research*. 2009; 144:215-24.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rabies fact sheet updated September 2017. [consultado 2021 jul. 11]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>.
3. Bleck TP. Rabies. In: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF. *Tropical infectious diseases: principles, pathogens & practice*. 2 ed., v. 1 Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia; 2006. p. 839-51.
4. Schuch DGM, Bertoldi DGM, Dâmaso AH, Paniz ADV, Vieira M. Adequação e foco no atendimento antirrábico humano pós-exposição em Pelotas-RS, 2007.
5. Carrieri ML. Raiva Humana: Estudo documental a partir de dados do Instituto Pasteur de São Paulo 1970-1997. [Dissertação de Mestrado em Saúde Pública]. Universidade de São Paulo, São Paulo; 1998.
6. Sellers TF; Fellow APHA. A new method for staining Negri Bodies of Rabies. *Am. J. Public Health*, v. 17, n. 10, p. 1080-1, 1927.
7. Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P. The fluorescent antibody test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editores. *Laboratory techniques in rabies*. 4. ed. Geneva: World Health Organization. 1996. p. 88-95.
8. Koprowski H. The mouse inoculation test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editores. *Laboratory techniques in rabies*. 4. ed. Geneva: World Health Organization. 1996; p. 80-7.
9. Castilho JG, Yamamoto K, Yoshitaka J, Scheffer KC, Carnieli JR P, Oliveira RN, Macedo CI, Achkar SM, Carrieri ML, Kotait I. Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A). *Bol. Epidemiológico Paulista* 2007; 4: 12-8.
10. Favoretto SR, Carrieri ML, Cunha ES, Aguiar EAC, Silva LHQ, Sodrê MM. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. *Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 2002; 44(2):91-5.
11. Kotait I, Carrieri ML, Takaoka NY. *Raiva – Aspectos Gerais e Clínica*. e ed. São Paulo. Instituto Pasteur, 2010.
12. Macedo CI, Carnieli P Jr, Brandão PE, Rosa EST, Oliveira RN, Castilho JG, Medeiros R, Machado RR, Oliveira RC, Carrieri ML, Kotait I. Diagnosis of human rabies cases by polymerase chain reaction of neck-skin samples. *Braz J Infect Dis*. 2006 Oct;10(5):341-5. doi: <https://doi.org/10.1590/s1413-86702006000500008>. PMID: 17293923.
13. Castilho JG, Macedo CI, Santos SO, Oliveira RN, Achkar SM, Carrieri ML, Kotait I, Carnieli P Jr. Método de diagnóstico antemortem da raiva humana por meio de técnicas de biologia molecular, utilizando saliva e biópsia de pele da região da nuca. *Bol. Epidemiológico Paulista*. 2013;10(112):4-12.
14. Willoughby RE, Tieves KS, Hoffman GM, Ghanayem NS, Amlieiefond CM, Schwabe MJ. Survival after Treatment of Rabies with Induction of Coma. *N Engl J Med*. 2005;352(24):2508-14.

15. OPAS OP de la S. Rabies [Internet]. Epidemiological Alert. 2014. Available from: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=46&Itemid=40766&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=46&Itemid=40766&lang=en)
16. Vargas A. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA RAIVA HUMANA NO BRASIL, 2000-2017. Universidade de Brasília – Faculdade de Ciências da Saúde – Programa de pós-graduação em Saúde Coletiva; p. 1-60, Brasília, 2018.
17. Carrieri ML, Takaoka NY, Kotait I, Germano PML. Clinical and Epidemiological Diagnosis for Human Rabies: Data from the Pasteur Institute from 1970 to 2002. Bol. Epidemiológico Paulista. 2006; 06(29): 2-8.
18. Mathuranayagam D & Vishnupriya PR. Antemortem diagnosis of human rabies by corneal impression smears using immunofluorescent technique. Indian J. Med. Res. 1984; 79:463-7.
19. SVS/MS – Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, 2020. <https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva>. Acesso: 06/01/2021.
20. Araújo FAA. Raiva humana no Brasil, 1992-2001. [dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte, MG: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais; 2002.
21. Wada MY, Rocha SM, Maia-Elkhoury ANS. Situação da Raiva no Brasil, 2000 a 2009. Epidemiol. serv. Saúde. 2011; 20(4): 509-18.
22. Vargas A, Romano APM, Merchán-Hamann E. Raiva humana no Brasil: estudo descritivo, 2000-2017\*. Epidemiol. Serv. Saude, Brasília, 28(2):e2018275, p. 1-9. 2019.

## Contribuição dos autores

Stefani Ferreira Rodrigues dos Santos: Investigação e Validação; Análise formal; Redação do rascunho e do texto original; Revisão e Edição do texto original. Graciane Maria Medeiros Caporale: Conceituação e Metodologia do projeto; Revisão e Edição do texto original. Carla Isabel Macedo: Redação do rascunho e do texto original; Revisão e Edição do texto original. Juliana Galera Castilho: Revisão e Edição do texto original. Karin Correa Scheffer: Conceituação e Metodologia do projeto; Redação do rascunho e do texto original; Revisão e Edição do texto original. Enio Mori: Redação do rascunho e do texto original; Revisão e Edição do texto original. Micheli Cochi: produção dos mapas, Revisão e Edição do texto original. Helena Beatriz Ruthner de Carvalho Batista: Revisão e Edição do texto original. Samira Achkar: Conceituação e Metodologia do projeto; Análise formal; Redação do rascunho e do texto original; Revisão e Edição do texto; Supervisão e Administração de Projeto.

## Preprint

O manuscrito não foi previamente publicado em servidores preprint.

## Aprovação dos autores

Os autores participaram efetivamente do trabalho, aprovam a versão final do manuscrito para publicação e assumem total responsabilidade por todos os seus aspectos, garantindo que as informações sejam precisas e confiáveis.

## Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesse de natureza política, comercial e financeira no manuscrito.

## Financiamento

Este estudo foi financiado pelo Instituto Pasteur de São Paulo, Brasil.