

Artigo Original

## Diagnóstico *ante-mortem* da raiva humana: anticorpos neutralizantes em soro e líquido cefalorraquidiano

### *Ante-mortem diagnosis of human rabies: virus-neutralizing antibodies in serum and cerebrospinal fluid*

Luciana Botelho Chaves<sup>1</sup>, Andréa de Cássia Rodrigues Silva<sup>1</sup>, Graciane Maria Medeiros Caporale<sup>1</sup>, Karin Corrêa Scheffer<sup>1</sup>, Salim Jorge Waquim Neto<sup>2</sup>, Maria Luiza Carrieri<sup>1</sup>, Ivanete Kotait<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Pasteur, da Coordenadoria de Controle de Doenças, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – IP/CCD/SES-SP

<sup>2</sup>Secretaria do Estado da Saúde do Maranhão – SES-MA

Suporte/financial support

Instituto Pasteur, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo e Secretaria de Estado da Saúde do Maranhão

#### Resumo

O diagnóstico laboratorial *ante-mortem* da raiva humana envolve a pesquisa do vírus em folículo piloso, saliva, líquido cefalorraquidiano (LCR) e impressões de córnea, e a pesquisa de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva (AcN) em amostras de soro e LCR. A presença de AcN no soro ou LCR de indivíduos não vacinados é indicativa de raiva, porém, esses resultados só ocorrem nos estágios finais da doença. Neste estudo foram analisados os resultados da pesquisa de AcN em amostras de soro e/ou LCR de três pacientes com suspeita de raiva, sem histórico de sorovacinação. O método de pesquisa de AcN foi o microteste simplificado de inibição de fluorescência. O paciente A, apesar de não ter tido análise de sistema nervoso central (SNC), teve diagnóstico de raiva com base nos sintomas clínicos e títulos de AcN de 3,0 UI/mL no soro e 0,37 UI/mL no LCR. Dos dois pacientes que tiveram o vírus identificado *post-mortem* no SNC, o paciente B apresentou LCR com título de 12,0 UI/mL de AcN e o paciente C apresentou resultados negativos de AcN no soro e no LCR, sendo compatíveis com a relação existente entre coleta e período de morbidade. Esses resultados mostram que a pesquisa de AcN de pacientes suspeitos de raiva, sem histórico de sorovacinação e com longo período de morbidade, deve ser feita em coletas subsequentes de soro e LCR, para possibilitar o diagnóstico *ante-mortem* da raiva, especialmente quando a coleta *post-mortem* de SNC tornar-se inviável.

**Palavras-chave:** raiva humana; diagnóstico *ante-mortem*; líquido cefalorraquidiano; anticorpos neutralizantes de vírus.

#### Abstract

The laboratorial *ante-mortem* diagnosis of human rabies include the detection of rabies virus in skin biopsy, saliva, cerebrospinal fluid (CSF), corneal smear and also the detection of rabies virus-neutralizing antibodies (VNA) in serum or CSF samples. The detection of rabies VNA in the serum or CSF of unvaccinated individuals is diagnostic of rabies, but it occurs late in course of the disease. In this study were analyzed the results of VNA in serum

and /or CSF of three cases of patients suspect of rabies, with no history of previous vaccination or passive immunization. The VNA evaluation was performed by the simplified fluorescence inhibition microtest. The patient A received diagnostic of rabies, despite of there wasn't analyses of central nervous system (CNS), supported by the clinical symptoms and results of VNA titers of 3,0 IU/mL in serum and 0,37 IU/mL in CSF. About the two patients who had the rabies virus identified for the techniques *post-mortem* in the CNS, the patient B presented 12 IU/mL of VNA in CSF and the patient C had negative results of VNA titers in serum and CSF samples, which were compatible to period of morbidity. These results indicated that the determination of VNA in serum and CSF samples of rabies human suspect cases, with no history of previous vaccination or passive immunization should contribute to *ante-mortem* diagnosis if successive collects were done to evaluate the progression of VNA titers establishing more safety in diagnostic, especially in those cases that the brain tissue can be collected for any reason.

**Key words:** human rabies; *ante-mortem* diagnosis; cerebrospinal fluid; virus neutralizing antibodies.

## Introdução

A raiva é uma infecção viral do sistema nervoso central (SNC) que causa encefalite e, uma vez que os sintomas clínicos aparecem, é invariavelmente fatal. A infecção normalmente ocorre por inoculação do vírus da saliva contaminada na pele por mordedura, arranhadura ou lambedura de mucosas<sup>1</sup>. Em raros casos a transmissão da raiva em humanos foi associada à inalação de aerossóis<sup>2</sup> e transplantes de órgãos<sup>3,4</sup>.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o número estimado de óbitos humanos causados pela raiva é de 55.000 casos por ano, principalmente em áreas rurais da África e da Ásia. O número de pessoas que recebem tratamento profilático após exposição a animal suspeito de infecção pelo vírus da raiva chega a dez milhões por ano<sup>5</sup>.

No Brasil, entre 1980 e 2004, houve uma redução significativa no número de casos registrados por ano, caindo de 173 para 30, representando uma queda de 83%. Em 2005, foram 45 casos de raiva humana e em 2006 esse número caiu para nove, sendo que a maioria dos casos de 2004 e 2005 ocorreu nas regiões Norte e Nordeste, tendo como principal transmissor o morcego hematófago<sup>6\*</sup>.

Atualmente, todos os Estados brasileiros têm à disposição, nas unidades de saúde, vacina produzida em cultura celular, de boa qualidade e alta potência, para a prevenção da doença. O soro contendo anticorpos contra o vírus da raiva está disponível nos hospitais de referência para ser usado quando indicado.

A raiva humana transmitida pelo cão está controlada na região Sul e em alguns Estados do Sudeste,

e há perspectiva de sua eliminação ainda nesta década. Em 1980, foram registrados 157 casos (89,7%) de raiva humana transmitida por cão ou gato e em 2004, somente seis casos (20%) transmitidos por esses mesmos animais. Esses resultados foram obtidos com a vacinação em massa de cães e gatos, principais transmissores do vírus, além de captura de animais errantes e bloqueio de focos<sup>6</sup>.

O diagnóstico *ante-mortem* consiste em pesquisa tanto de vírus da raiva em amostras de saliva, líquido cefalorraquidiano (LCR), impressões de córnea e biópsia de pele, como também por pesquisa de anticorpos neutralizantes do vírus (AcN) em amostras de soro e LCR<sup>7</sup>.

A estimulação de linfócitos B para síntese de imunoglobulinas na infecção natural geralmente não ocorre antes de os sintomas clínicos aparecerem. A produção de anticorpos neutralizantes (AcN) se dá após a infecção disseminada do SNC, em resposta à quantidade maciça de antígeno viral gerado que entrou em contato com o sistema retículo endotelial. O título de AcN permanece baixo até a fase terminal da doença e atinge seu pico próximo da morte<sup>8,9</sup>.

A escolha das técnicas para diagnóstico *ante-mortem* varia muito de acordo com o estágio da doença; a detecção de antígeno é geralmente sensível durante os primeiros dias, enquanto AcN em LCR e soro tendem a aparecer depois de 7 a 10 dias da doença<sup>10</sup>. Portanto, a presença de AcN no soro e/ou no LCR de indivíduos sem histórico recente de imunização contra a raiva é indicativo de infecção pelo vírus, mas esses títulos só aparecem tardiamente<sup>11</sup>.

\*Fonte: COVEV/CGDT/DEVEP/SVS/MS

O diagnóstico precoce dos casos de raiva humana é essencial para determinar a fonte de infecção e, conseqüentemente, a adoção de medidas de controle da doença, tais como evitar tratamentos e procedimentos inadequados ao paciente, diminuir os contatos com o mesmo e indicar a profilaxia pós-exposição aos indivíduos que tiveram contato com paciente infectado<sup>12</sup>.

O objetivo desse estudo foi analisar os resultados da pesquisa de AcN do vírus da raiva utilizada como técnica de diagnóstico *ante-mortem*, em três casos de pacientes suspeitos de raiva.

## Material e métodos

### Relato dos casos

As informações referentes aos sintomas clínicos dos pacientes e tempo de morbidade foram retiradas das requisições de exames, encaminhadas juntamente com as amostras destinadas ao diagnóstico laboratorial da raiva para o Instituto Pasteur de São Paulo.

O paciente A era do sexo feminino, tinha 6 anos de idade e histórico de agressão na mão por morcego hematófago. Os primeiros sintomas, dor no pescoço e abdômen, apareceram aproximadamente um mês após a agressão, seguidos de febre, vômitos e confusão mental. As amostras de soro e LCR foram coletadas 19 dias após os primeiros sintomas e 11 dias antes do óbito. Uma lâmina contendo impressões de córnea também foi coletada para a pesquisa de vírus. O LCR e uma amostra de saliva também foram analisados para isolamento viral. Não foi realizada a coleta de amostra de sistema nervoso central (SNC) para o exame *post-mortem*.

O paciente B era do sexo masculino, 27 anos de idade, com histórico de agressão por mordedura de cão em membro superior. Uma amostra de LCR foi coletada 20 dias após os primeiros sintomas, o mesmo dia em que ocorreu o óbito. Não houve envio de amostra de soro. Após o óbito foi coletado fragmento do SNC para o diagnóstico viral.

O paciente C era do sexo masculino, 47 anos de idade. Foi realizada a coleta de soro e de LCR 20 e 23 dias antes do óbito, respectivamente. Amostras de saliva, LCR e SNC foram examinadas para a pesquisa de antígeno viral.

### Deteção do vírus da raiva

A pesquisa de antígeno rábico foi realizada nas amostras de SNC e lâminas com impressão de córnea pela técnica de imunofluorescência direta<sup>13</sup>. A técnica de isolamento viral por inoculação em camundongos foi realizada nas amostras de SNC, LCR e saliva<sup>14</sup>.

## Avaliação dos títulos de anticorpos neutralizantes

A pesquisa de AcN foi feita em amostras de soro e LCR pelo microteste simplificado de inibição de fluorescência<sup>15</sup>.

Diluições duplas seriadas das amostras e do soro padrão foram feitas em um volume final de 100µL em microplacas de 96 orifícios. O volume de 50µL da suspensão de vírus PV, com diluição capaz de infectar de 80% a 100% das células, foi acrescentado ao soro diluído e as microplacas foram incubadas durante uma hora, a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram adicionados 50µL de suspensão de células BHK-21 (1 X 10<sup>6</sup> células/mL) e a microplaca foi novamente incubada por mais 24 horas, a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

O meio de cultura foi aspirado das placas e as células foram fixadas com acetona gelada diluída a 80% em água destilada. As placas foram secas e incubadas com conjugado fluorescente anti-ribonucleoproteínas (RNPs) do vírus da raiva, produzido no Instituto Pasteur, durante uma hora, a 37 °C. As placas foram lavadas com PBS e depois com água destilada e em seguida foram adicionados, a cada orifício, 50µL de glicerina diluída a 10% em tampão PBS 0,01M, pH 7,0. A leitura foi realizada em microscópio invertido de fluorescência, com aumento de 100 vezes, determinando a diluição que apresentou 50% de infecção. O título foi obtido por comparação com soro padrão homólogo contendo 300 UI/mL.

## Resultados

Os resultados dos testes laboratoriais realizados com as amostras recebidas para diagnóstico de raiva estão resumidos nas Tabelas 1 e 2. A Tabela 1 apresenta os resultados de dosagem de AcN *ante-mortem* fazendo a associação com o período da coleta da amostra. A Tabela 2 apresenta os resultados da pesquisa de antígeno viral *ante-mortem* e *post-mortem*.

Tabela 1. Resultados das amostras dos pacientes submetidas ao diagnóstico sorológico *ante-mortem* relacionando o dia da coleta com o período de morbidade.

Paciente	Amostras	DAD	DAO	AcN UI/mL
A	Soro	19	11	3,00
	LCR	19	11	0,37
B	LCR	20	0	12,00
C	LCR	*	23	< 0,06
	Soro	*	20	< 0,06

DAD: dias após primeiros sintomas (doença)

DAO: dias antes do óbito

\*Dado não informado

AcN: anticorpos neutralizantes

LCR: líquido cefalorraquidiano

Tabela 2. Resultados das amostras dos pacientes submetidas ao diagnóstico virológico.

Pacientes	Amostra	IFD/PB
A	Córnea-teste	Negativo
	LCR	Negativo
	Saliva	Negativo
B	SNC	Positivo
C	Saliva	Positivo
	LCR	Negativo
	SNC	Positivo

IFD: imunofluorescência direta

PB: prova biológica

LCR: líquido cefalorraquidiano

SNC: sistema nervoso central

## Discussão

Os resultados obtidos neste estudo confirmam as afirmações de que o diagnóstico da raiva humana é, geralmente, sugerido por achados epidemiológicos e clínicos e confirmado no laboratório; que o diagnóstico não é difícil se existir uma história de exposição por mordida de animal e ocorrerem sintomas e sinais característicos; e que pacientes com sinais ou sintomas neurológicos ou com encefalite não explicada devem ser questionados sobre a possibilidade de exposição a animal em áreas endêmicas de raiva<sup>16,17</sup>.

Na análise do caso do paciente A observou-se que, apesar de não ter havido envio de amostra de sistema nervoso central para exame *post-mortem*, o diagnóstico foi definido levando em conta os sintomas clínicos, o histórico de agressão, a ausência de imunização contra a raiva e altos títulos de AcN no soro, bem como a presença destes no LCR. Casos como este foram muito bem documentados nos relatos de cinco pacientes que tiveram recuperação após apresentarem sintomas da doença e receberem tratamento profilático. De nenhum deles foi possível o isolamento do vírus, mas o aumento nos títulos de AcN no soro e no LCR, o que é indicativo de infecção, confirmaram o diagnóstico clínico de raiva<sup>11,16,18,19,20,21,22</sup>.

O mesmo ocorreu no primeiro caso descrito de recuperação de raiva sem nenhum tipo de profilaxia pré ou pós-exposição, em que a paciente tinha histórico de agressão por morcego, apresentava sinais característicos da raiva e sintomas neurológicos. As amostras de folículo piloso e saliva foram negativas no diagnóstico *ante-mortem* para o vírus da raiva, mas nas amostras de soro e LCR foram detectados anticorpos específicos e em exames de coletas subseqüentes de LCR foi observado um aumento significativo no título de anticorpos<sup>23</sup>.

O elevado título de AcN encontrado na análise de amostra de LCR do paciente B foi bastante coerente com o tempo de doença e o momento da coleta, realizada no mesmo dia do óbito. Este achado é

concordante com relatos anteriores de pacientes com diagnóstico de raiva, como em um caso ocorrido na França em 1992, em que o paciente teve amostras de soro e LCR negativas para presença de AcN do vírus da doença, coletadas 15 dias antes do óbito, enquanto a segunda amostra de soro, coletada quatro dias antes do óbito, apresentou resultado positivo para AcN e uma amostra de LCR coletada no dia do óbito foi positiva<sup>24</sup>. Da mesma forma, em outro caso de raiva humana ocorrido no Tennessee (EUA), em 2002, somente as amostras de soro e LCR coletadas dois dias antes do óbito apresentaram resultados positivos na pesquisa de AcN do vírus da doença<sup>25</sup>.

No caso do paciente C, os resultados negativos encontrados na pesquisa de AcN do vírus da raiva em amostras de soro e LCR também foram coerentes com o momento da coleta das amostras, a qual ocorreu muitos dias antes do óbito e logo após os primeiros sintomas de doença. Estudos laboratoriais testando a presença de anticorpos no soro e no LCR têm baixo valor devido ao aparecimento tardio, portanto, raramente no início dos sintomas<sup>26</sup>. Por isso, a coleta de amostras de soro e LCR para pesquisa de anticorpos específicos para o vírus da raiva deve ser feita a partir de uma semana após o aparecimento dos sintomas da doença<sup>12</sup>.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam aqueles encontrados na análise feita de 55 casos de raiva humana, 39 ocorridos nos Estados Unidos e 16 na França, no período de 1970 a 1997, em que houve diagnóstico *ante-mortem* a partir das amostras de soro e LCR avaliadas para presença de AcN. Nestes casos observou-se que quanto mais próxima do óbito foi feita a coleta de amostras, maior o número de pacientes que apresentaram AcN do vírus da raiva<sup>12</sup>.

Portanto, estes resultados comprovam que a análise laboratorial de amostras de soro e LCR de pacientes suspeitos de raiva e sem histórico de imunização contra a raiva contribui para o diagnóstico *ante-mortem*, desde que sejam feitas coletas subseqüentes para avaliar o aumento progressivo dos títulos de anticorpos neutralizantes. Isso evidencia a infecção, propiciando maior segurança no diagnóstico, principalmente nos casos em que a coleta do sistema nervoso é inviável.

## Referências bibliográficas

1. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Human Rabies Prevention United States, 1999. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR** 1999 jan 8; 48 (RR-1): 1-21.

2. Constantine DG. Rabies transmission by no bite route. **Public Health Rep.** 1962, 77: 287-289.
3. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Investigation of rabies infections in organ donor and transplant recipients- Alabama, Arkansas, Oklahoma, and Texas, 2004. **MMWR** 2004 jul 9; 53(26):586-589.
4. Bronnert J, Wilde H, Tepsumethanon V, Lumlerdacha B, Hemachudha T. Organ Transplantations and Rabies Transmission. **J Travel Med.** 2007; 14(3):177-180.
5. WHO. World Health Organization. Rabies. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099> [2006 dezembro 22].
6. MS. Ministério da Saúde. Dados sobre a raiva. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/raiva\\_2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/raiva_2006.pdf) [2007 abril 08].
7. WHO. World Health Organization. *Intra-vitam* diagnosis. Disponível em: [http://www.who.int/rabies/human/intra\\_vitam/en/print.html](http://www.who.int/rabies/human/intra_vitam/en/print.html) [2007 maio 07].
8. Murphy FA. Rabies Pathogenesis. **Arch Virol.** 1977; 54:279-297.
9. Hattwick MAW, Gregg MB. The disease in man. In: Baer GM. ed. **The Natural History of Rabies** 1975; Vol II: p.281-305.
10. WHO. World Health Organization. Expert Committee on Rabies. Eighth report. WHO Technical Report Series; 824. Geneva 1992.
11. Warrell MJ, Warrell DA. Rabies and other lyssavirus diseases. **The Lancet** 2004 mar 20; 363:959-969.
12. Crepin P, Audry L, Rotyvel Y, Gacoin A, Carroff C, Bourhy H. Intra vitam diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. **J Clin Microbiol.** 1998, 36(4): 1117-1121.
13. Dean DJ, Ableseth MK, Atanasiu P. The fluorescent antibody test In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowsky H. **Laboratory techniques in rabies** 1996. Geneva: World Health Organization; p. 88-95.
14. Koprowsky H. The mouse inoculation test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowsky H. **Laboratory techniques in rabies** 1996. Geneva: World Health Organization; p. 80-87.
15. Favoretto SR, Carrieri ML, Tino MS, Zanetti CR, Pereira OAC. Simplified fluorescence inhibition microtest for the detection of rabies neutralizing antibodies. **Rev Inst Med trop S Paulo** 1993; 35:171-175.
16. Rupprecht CE. Rhabdoviruses: Rabies Virus. In: Baron S, Peake RC, James DA, Susman M, Kennedy CA, Singleton MJD, Schuenke S. *Medical Microbiology*. Fourth Edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>. [2007 maio].
17. Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T. Rabies re-examined. **The Lancet Infect Dis.** 2002 June 2; 327-343. Disponível em: <http://infection.thelancet.com>.
18. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Rabies in a laboratory worker New York. **MMWR** 1977; 26:183-184.
19. Hattwick MA, Weis TT, Stechschulte CJ, Baer GM, Gregg MB. Recovery from rabies. A case report. **Ann Intern Med.** 1972; 76:931-942.
20. Porras C, Barboza JJ, Fuenzalida E, Adaros HL, Oviedo AM, Furst J. Recovery from rabies in man. **Ann Intern Med.** 1976; 85: 44-48.
21. Alvarez L, Fajardo R, Lopez E, Pedroza R, Hemachudha T, Kamolvarin N, Cortes G, Baer GM. Partial recovery from rabies in a nine-year-old boy. **Pediatr Infect Dis J.** 1994; 13:1154-1155.
22. Madhusudana SN, Nagaraj D, Uday M, Ratnavalli E, Kumar MV. Partial recovery from rabies in a six-year-old girl. **Int J Infect Dis.** 2002; 6:85-86.
23. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Recovery of a Patient from Clinical Rabies - Wisconsin, 2004. **MMWR** 2004; 53 (50):1171-1173.
24. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Imported human Rabies-France, 1992. **MMWR** 1992 december; 41(51):953-955.
25. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Human Rabies Tennessee, 2002. **MMWR** 2002 september 20; 51(37): 828-829.
26. Hemachudha T, Wacharapluesadee S. Antemortem diagnosis of human rabies. **Clin Infect Dis.** 2004; 39:1085-1086.

Correspondência/Correspondence to:  
Instituto Pasteur  
Av. Paulista, 393  
Jardins - São Paulo/SP  
CEP: 01311-000  
E-mail: lbchaves@pasteur.saude.sp.gov.br