

41. Diagnóstico de raiva

41.1 Imunofluorescência direta para raiva

1. Cortar o tecido suspeito e fazer duas ou três impressões na lâmina, cuidando para não fazer uma impressão muito espessa. Sempre prepare uma lâmina controle (+) de um cérebro positivo. Fazer impressão das seguintes regiões: hipocampo, cerebelo, medula, cortex frontal e lateral.
2. Fixar em acetona -20°C por 10 minutos.
3. Lavar a lâmina várias vezes em PBS e água destilada.
4. Secar a lâmina em temperatura ambiente.
5. Demarcar com esmalte a melhor impressão do tecido, aquela com menor quantidade de tecido preso na lâmina.
6. Adicionar o anticorpo conjugado (titulado previamente, geralmente 1:100) com a FITC* e incubar por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Cuidar para que o anticorpo cubra toda a superfície da impressão.
7. Lavar a lâmina várias vezes em PBS e água destilada.
8. Secar a lâmina a temperatura ambiente.
9. Montar a lâmina e lamínula com PBS/Glicerol (1:1) e realizar a leitura no microscópio de epifluorescência.

*O anticorpo conjugado deve ser diluído em **solução de cérebro de camundongo normal (CCN)**. Para fazer a solução de CNN é necessário:

- 2g de cérebro de camundongo normal, que deverá ser macerado em cadinho;
- Adicionar 8ml de PBS pH7,4;
- Agitar em vortex;
- Centrifugar 2000rpm 5min;
- Coletar o sobrendante e usar para diluir o Ac.

41.2 Prova biológica para raiva

1. Cortar porções de hipocampo, cerebelo, medula, cortex frontal e lateral.
2. Macerar o tecido com auxílio de areia estéril. Para cada grama de tecido macerado adicionar 5mL de MEM (2x antibiótico) e homogeneizar a mistura.
3. Centrifugar a 3.000 rpm por 10 minutos. Coletar o sobrenadante que será utilizado para inoculação dos animais.
4. Inocular 20µL do sobrenadante pela via intracerebral em camundongos lactentes (entre 7-10 dias de idade).
5. Monitorar os animais diariamente durante 21 dias.
6. O cérebro dos animais que vierem a morrer após o 4º dia pós-inoculação, deve ser submetido ao teste de imunofluorescência.

OBS.:

- Mortalidade nos 4 primeiros dias pós-inoculação é atribuída à inoculação, e deve ser desconsiderada;
- Sinais clínicos da raiva: apatia, emagrecimento dificuldade respiratória, sinais neurológicos.