TATIANE DE CASSIA PARDO DE SOUZA

Estudo da distribuição do vírus da raiva (RABV) em amostras de sistema nervoso central e glândulas salivares de equinos naturalmente infectados

São Paulo
2019

TATIANE DE CASSIA PARDO DE SOUZA

Estudo da distribuição do vírus da raiva (RABV) em amostras de sistema nervoso central e glândulas salivares de equinos naturalmente infectados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Ênio Mori

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3765
FMVZ

Souza, Tatiane de Cassia Pardo de
Estudo da distribuição do vírus da raiva (RABV) em amostras de sistema nervoso central e glândulas salivares de equinos naturalmente infectados / Tatiane de Cassia Pardo de Souza. – 2019.
81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Ênio Mori.

1. Equino. 2. Raiva. 3. RT-qPCR. 4. RT-PCR. 5. Sensibilidade. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da distribuição do vírus da raiva (RABV) em amostras de sistema nervoso central e glândulas salivares de equinos naturalmente infectados", protocolada sob o CEUA nº 9179200217 (ID 003786), sob a responsabilidade de **Enio Mori** *e equipe; Tatiane de Cassia Pardo de Souza* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/07/2017.

We certify that the proposal "Study of the distribution of rabies virus (RABV) in central nervous system and salivary gland samples from naturally infected horses", utilizing 20 Equines (males and females), protocol number CEUA 9179200217 (ID 003786), under the responsibility of **Enio Mori** *and team; Tatiane de Cassia Pardo de Souza* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 07/03/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 03/2017 a 03/2019 Área: Patologia Experimental E Comparada

Origem:	Amostras biológicas estocadas						
Espécie:	Equídeos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 20 anos	N:	20
Linhagem:	não se aplica			Peso:	100 a 500 kg		

Local do experimento: Instituto Pasteur e VPT-FMVZ/USP

São Paulo, 20 de dezembro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Souza, Tatiane de Cassia Pardo

Título: **Estudo da distribuição do vírus da raiva (RABV) em amostras de sistema nervoso central e glândulas salivares de equinos naturalmente infectados**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência

Data:_____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A minha mãe **Ana Célia Pardo de Souza** *in memorian* **(**pois sei que se estivesse presente certamente se alegraria com mais essa conquista) e ao meu pai **José Leite de Souza** e meus irmãos **Denis** e **Kleber** por toda dedicação, apoio, amor, conselhos e tudo mais que ofereceram durante toda a vida!

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter chegado até aqui e a encontrar forças necessárias para vencer os obstáculos e dado sabedoria para concluir mais esta etapa da minha vida.

Aos meus **pais Ana Célia** *(in memorian)* e **José** e família pelo amor e apoio oferecidos a mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Ênio Mori**, agradeço imensamente pela confiança, ótima orientação, pela paciência, força, empenho, ensinamentos e participação em todas as etapas deste trabalho para poder concluí-lo.

Aos meus irmãos **Denis Leite de Souza e Kleber Leite de Souza**, pelos conselhos e apoio para chegar até aqui. Ao meu novo sobrinho **Bernardo** que está chegando.

Aos meus sobrinhos **Ana Beatriz** e **Gabriel**, por todo carinho com a titia e minha cunhada **Nádia** pelo apoio e carinho.

A minha prima **Anna Therra** por todo apoio, ajuda e carinho.

A Profª Dra. **Cláudia Mori por** abrir as portas do laboratório e pelos auxílios no meu projeto de Mestrado e pela ajuda dada em especial ao **Dennis** e **Leonardo**.

A todos os pesquisadores do **Instituto Pasteur**, por sempre terem me acolhido tão bem desde o aprimoramento profissional e torcerem por mim, em especial a **Karen Miyuki Asano, Keila Iamamoto Nogi, Willian de Oliveira Fahl, Luciana Botelho Chaves, Samira Maria Achkar, Helena Beatriz Bastista de Carvalho Ruthner, Fernanda Guedes Ruiz, Elaine Raniero Fernandes, Karin Corrêa Scheffer Ferreira, Pedro Carnielli Junior, Graciane Maria Medeiros Caporale, Juliana Galera Castilho Kawai, Rafael Novaes, Adriana C. R. Nasraui, Sandriana, Carla Macedo Soares.**

A todos os funcionários do **Instituto Pasteur,** por terem me recebido tão bem sempre desde o Aprimoramento Profissional, e pelos conhecimentos transmitidos e ajuda só acrescentaram na minha formação em especial **Kátia Cristina, Maria Aparecida da Silva – "Cidoka", Fernanda, Samanta, Silvio, Rose e Elizabeth Cardoso e Carmen, Jane, Eliana, Renê Cunha Neto.**

As amigas que fiz durante o Aprimoramento Profissional, Investigação Científica e Mestrado (USP) no **Instituto Pasteur**, especialmente **Natalia, Patrícia, Marcelia, Viviane, Thais, Débora, Camila,** pelas conversas, cafés, conhecimento compartilhado, ajuda e risadas foi muito bom. E também agradeço aos novos amigos colegas feitos nessa jornada: **Yasmim, Jaine e Maria Eduarda e aos demais bolsistas** agradeço pelo apoio, conversas e conhecimento compartilhado e ajuda.

Agradeço aos demais **amigos** que sempre estão por perto ou apesar de qualquer distância imposta pelas circunstâncias da vida.

Ao **Instituto Pasteur**, em nome da Sra. Diretora, Dra. **Luciana Hardt** e da chefia do laboratório: **Andréa de Cássia Rodrigues da Silva**, pela oportunidade valiosa de disponibilizarem condições necessárias para a realização do meu trabalho.

À **FMVZ/USP, em** especial ao Departamento de Patologia, por fornecer as condições e estrutura necessárias para que eu pudesse obter o melhor desenvolvimento possível.

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio Financeiro por meio de Auxílio Pesquisa (processo 15/17807-0).

Meu muito obrigada a Deus e a toda **espiritualidade superior** por toda sua proteção e auxílio em todos os momentos da minha vida. Tenho a plena certeza de que Ele nunca me abandonou!

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

RESUMO

SOUZA, T. C. P. **Estudo da distribuição do vírus da raiva (RABV) em amostras de sistema nervoso central e glândulas salivares de equinos naturalmente infectados.** [Study of rabies virus (RABV) distribution in central nervous system and salivary gland tissues from naturally infected equine]. 2019. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Os testes para diagnóstico da raiva devem apresentar rapidez, alta sensibilidade e especificidade na obtenção dos resultados. No entanto, em amostras de equinos, muitas vezes, pode-se observar uma sensibilidade na imunofluorescência direta (IFD) mais baixa quando comparada com aquela de outras espécies. Em decorrência disto, a implantação de novas ferramentas no diagnóstico poderá diminuir o número de resultados falso negativos. No presente estudo foi utilizado o SNC de 80 equinos originários de municípios do estado de São Paulo, encaminhados para a Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur no período de abril de 2017 a abril de 2018. As amostras utilizadas foram processadas para IFD, isolamento viral em cultivo de células (IVCC), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). Das 80 amostras analisadas de SNC de equinos, 25 (31,25%) apresentaram resultado positivo para raiva em pelo menos uma das técnicas mencionadas. Ao avaliar a positividade, comparando os resultados entre as técnicas, a IFD apresentou 96% (24/25), IVCC 44%(11/25), RT-PCR 100% (25/25) e RT-qPCR 100% (25/25). Analisando 161 estruturas do SNC separadamente [córtex, hipocampo, cerebelo, tronco cerebral (mesencéfalo, ponte e bulbo) e medula cervical, espinhal e lombar] de 25 cavalos positivos, as taxas de positividade foram para 72,0%, 89,4% e 75,2% para IFD, RT-PCR e RT-qPCR, respectivamente. Cerca de 33% das estruturas do SNC (53/161) apresentaram rara presença de antígeno, com apenas uma a três pequenas inclusões em todo o campo microscópico pesquisado, sendo classificadas como fracas positivas. O mesencéfalo apresentou a melhor distribuição viral nas estruturas do SNC tanto pela técnica de IFD quanto pelas técnicas moleculares (RT-PCR e RT-qPCR). Esse fato sugere que a variabilidade na intensidade da distribuição do vírus em diferentes partes do SNC (padrões neuroinvasivos) em equinos pode influenciar a detecção de RABV. A detecção de presença viral em glândulas salivares mostrou-se positiva, indicando o potencial destes animais atuarem como fonte de infecção para raiva.

Palavras-chave: Equino. Raiva. RT-qPCR. RT-PCR. Sensibilidade.

ABSTRACT

SOUZA, T. C. P. Study of rabies virus (RABV) distribution in central nervous system and salivary gland tissues from naturally infected equine. [**Estudo da distribuição do vírus da raiva (RABV) em amostras de sistema nervoso central e glândulas salivares de equinos naturalmente infectados]**. 2019. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Tests to diagnose rabies must be rapid, highly sensitive and highly specific in obtaining the results. However, a lower sensitivity to the direct fluorescent antibody (DFA) may be observed in equine central nervous system (CNS) samples when compared to those of other species. The use of new tools for rabies diagnosis in equine specimens may reduce the occurrence of false-negative results. In the present study, the CNS from 80 horses were obtained from April 2017 to April 2018 as a result of rabies surveillance operations established in the São Paulo state. The samples were tested at the Pasteur Institute of São Paulo's Rabies Diagnosis Section by DFA, rabies tissue culture infection test (RTCIT), RT-PCR, and RT-qPCR. Out of the 80 analyzed CNS samples from horses, 25 were positive for rabies (positivity rate = 31.25%) at least in one of the mentioned techniques. Of these positive cases, 96% (24/25) were confirmed by using the DFA test. 25 CNS samples were positive for both RT-PCR and RT-qPCR, with 100% sensitivity. Only 11 of the 25 CNS samples were positive (44%) by RTCIT. When the 161 CNS structures were analyzed separately [cortex, hippocampus, cerebellum, brainstem (midbrain, pons, and bulb) and cervical, lumbar and spinal cord] from 25 positive horses, the positivity rates were 72.0%, 89.4% and 89.6% for DFA, RT-PCR, and RT-qPCR, respectively. About 33% CNS structures (53/161) showed a rare presence of antigen, with only one to three small inclusions in the entire microscopic field searched, being classified as weak positive. Midbrain showed the best viral distribution in the CNS structures by both the DFA and the molecular techniques RT-PCR /RT-qPCR. This fact suggests that the variability in the intensity of virus distribution in different parts of the CNS (neuroinvasive patterns) in horses may influence the detection of RABV. The detection of RABV in salivary glands was positive, indicating the potential of these animals as a source of infection for rabies.

Keywords: Equine. Rabies. RT-qPCR. RT-PCR. Sensitivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia representativa de encéfalo equino recebido na Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur/SP. A) Encéfalo antes do início do processamento com aspecto sanguinolento, indicando a presença de hemorragia. B) Observa-se as seguintes estruturas de SNC: 1) cerebelo, 2) tálamo, 3) mesencéfalo, 4) ponte, 5) bulbo, 6) medula cervical e 7) medula lombar. C) Em destaque hipocampo ou corno de Amon..... 33

Figura 2 - Mapa do Estado de São Paulo com as subdivisões em Grupo de Controle Epidemiológico (GVE)..... 34

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Produtos amplificados com tamanho de 248 pb obtidos com oligonucleotídeos iniciadores (primers) para a região do gene do RABV que codifica a nucleoproteína (N). M: marcador de tamanho de 100 pb..... 40

Figura 4 - Frequência em porcentagem (%) das classes de concentração antigênica e viral dos fragmentos do sistema nervoso central de equinos positivos para a raiva, pelas técnicas de imunofluorescência direta (IFD), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase tempo real (RT-qPCR) para diagnóstico da raiva para os fragmentos analisados..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos fragmentos de SNC de equinos do Estado de São Paulo encaminhados para a Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Pasteur/SP no período de abril de 2017 a abril de 2018..... 36

Tabela 2 - Municípios de origem das amostras de SNC de equinos positivos do Estado de São Paulo encaminhados para a Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Pasteur/SP no período de abril de 2017 a abril de 2018..... 44

Tabela 3 - Frequência da distribuição dos fragmentos de SNC de equinos positivos para raiva do Estado de São Paulo encaminhados para a Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Pasteur/SP no período de abril de 2017 a abril de 2018..... 45

Tabela 4 - Sinais clínicos associados aos prováveis locais de lesão no SNC encontrados nos 25 equinos positivos para o RABV do Estado de São Paulo, recebidos no Instituto Pasteur durante o período de abril de 2017 a abril de 2018..... 49

Tabela 5 - Sensibilidade (S) e especificidade (E) das técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para diagnóstico da raiva nas amostras de sistema nervoso central de equinos..... 52

Tabela 6 - Índice de concordância de *Kappa* entre as técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para diagnóstico da raiva nas amostras de SNC de equinos..... 53

Tabela 7 - Resultados obtidos pela técnica de imunofluorescência direta (IFD) para a distribuição antigênica do RABV..... 55

Tabela 8 - Resultados obtidos nas técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase tempo real (RT-qPCR) para diagnóstico da raiva para os fragmentos analisados..... 56

Tabela 9 - Resultados obtidos pela técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) convencional para o diagnóstico da raiva..... 57

Tabela 10- Resultados obtidos pela técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) convencional para o diagnóstico da raiva..... 58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Distribuição dos resultados para a raiva das amostras dos equinos recebidas no Instituto Pasteur de Estado de São Paulo durante o período de abril de 2017 a abril de 2018..... 46

Gráfico 2- Distribuição quanto à faixa etária dos equinos positivos para raiva do Estado de São Paulo, expressos em porcentagem (%), recebidos no Instituto Pasteur durante o período de abril de 2017 a abril de 2018..... 47

Gráfico 3- Perfil racial dos equinos com diagnóstico positivo para raiva do Estado de São Paulo, recebidos no Instituto Pasteur durante o período de abril de 2017 a abril de 2018. Resultados expressos em porcentagem (%)..... 47

Gráfico 4- Duração do período de evolução da doença nos equinos positivos para a raiva do Estado de São Paulo, expressos em horas, recebidos no Instituto Pasteur durante o período de abril de 2017 a abril de 2018..... 48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Casos de raiva em equino no estado de São Paulo e Brasil e abrigos de morcegos hematófagos em São Paulo..... 23

Quadro 2 - Principais manifestações clínica da raiva em equinos..... 26

Quadro 3 - Municípios de origem das amostras de SNC de equinos do Estado de São Paulo encaminhados para a Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Pasteur/SP no período de abril de 2017 a abril de 2018..... 35

Quadro 4 - Relação de oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados na RT-PCR para a identificação do RABV direcionados à região do gene codificador da proteína N e as respectivas regiões de hibridização (Orciari et al., 2001) 39

Quadro 5 - Condições de temperatura e tempo para os ciclos da PCR convencional para amplificação do gene codificador da proteína N do RABV..... 40

Quadro 6 - Condições de temperatura e de tempo selecionadas para cada ciclo da RT-PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green para amplificação do gene codificador da proteína N do RABV..... 42

Quadro 7 - Resultado das amostras de sistema nervoso central de equinos positivas com relação as técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase tempo real (RT-qPCR), óbito, evolução do óbito em horas e vacinação..... 51

Quadro 8 - Amostras das glândulas de equinos positivos para o RABV de acordo com os resultados obtidos pela técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) convencional para o diagnóstico da raiva..... 58

Anexo A – Resultado das amostras positivas e negativas para a raiva nas técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase tempo real (RT-qPCR) nas amostras do sistema nervoso central de equinos..... 79

Anexo B - Resultados obtidos pela técnica de imunofluorescência direta (IFD) para o diagnóstico da raiva..... 80

Anexo C – Resultados obtidos pelos métodos moleculares: Ciclo de quantificação (Cq) do RT-qPCR e as diferenças entre as estruturas do SNC..... 81

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	18
2	**OBJETIVOS**	32
2.1	OBJETIVOS GERAIS	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	**MATERIAL E MÉTODOS**	33
3.1	MATERIAL	33
3.2	MÉTODOS	36
3.2.1	**Colheita de amostras**	36
3.2.2	**Técnica de Imunofluorescência Direta (IFD)**	36
3.2.3	**Preparo da suspensão para isolamento viral**	37
3.2.4	**Isolamento viral**	38
3.2.5	**Extração RNA total**	38
3.2.5.1	Glândulas salivares	38
3.2.5.2	Sistema Nervoso Central e Glândulas salivares	38
3.2.6	**Transcrição reversa – síntese do DNA complementar**	38
3.2.7	**Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional para detecção do ácido nucléico do RABV**	39
3.2.8	**Sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger**	40
3.2.9	**Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (qPCR) pelo sistema SYBR Green**	41
3.3	ANÁLISE DOS RESULTADOS	42
3.3.1	**Cálculo da Especificidade e Sensibilidade diagnósticas**	42
3.3.2	**Coeficiente de Concordância de *Kappa***	43
4.	**RESULTADOS**	44
5.	**DISCUSSÃO**	61
6.	**CONCLUSÃO**	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS	78

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem o quarto maior rebanho de equinos do mundo, com aproximadamente 5,5 milhões de animais, e o estado de São Paulo detém uma população de 350 mil cavalos sendo a sétima unidade da federação em número de animais no país de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017).

A equinocultura é um setor importante do agronegócio brasileiro, responsável por gerar R$ 6 bilhões por ano, e emprega cerca 610 mil pessoas de forma direta e 2.430 milhões de forma indireta. Assim, gera mais de três milhões de ocupações no setor do agronegócio de cavalos, no qual se destaca um crescimento na criação destes animais para o público urbano, tanto na área de lazer quanto na de esporte que requer maiores cuidados e gastos em medicamentos, ferragens e acessórios (LIMA; CINTRA, 2016).

As encefalites que acometem esta espécie são de extrema importância, uma vez que doenças que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC) de cavalos são comumente fatais e algumas têm capacidade zoonótica. A raiva se acentua como a mais evidente dentre as enfermidades neurológicas. Neste âmbito, é primordial que sejam elaborados análises, informações e diagnóstico etiológico apropriados de vigilância epidemiológica das doenças neurológicas em equinos (COSTA et al., 2015).

A raiva é uma antropozoonose, causada por um vírus, caracterizada por uma encefalomielite, de evolução rápida, de caráter progressivo e geralmente fatal. Além da letalidade próxima de 100%, com poucos casos descritos de cura no mundo, trata-se de uma doença de elevado custo social e econômico tanto na saúde pública quanto animal (WILLOUGHBY et al., 2005; CALDAS et al., 2009).

O vírus da raiva (RABV) é classificado como pertencente ao filo *Negarnaviricota*, subfilo *Haploviricotina*, classe *Monjiviricetes*, ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* e espécie *Rabies lyssavirus* (ICTV, 2018). É um vírus neurotrópico, o que quer dizer que após a sua entrada no hospedeiro, o agente etiológico percorrerá um caminho no organismo que o conduzirá ao SNC, no qual ocorre a replicação viral e posterior disseminação centrífuga sistêmica para órgãos e estruturas periféricas, como por exemplo, as glândulas salivares. O RABV é um vírus envelopado que possui genoma composto por RNA fita-simples, senso negativo, não-segmentado e que codifica cinco proteínas estruturais associadas a ribonucleoproteína (RNP) ou envelope. As proteínas L (transcriptase), N (nucleocapsideo) e P (fosfoproteína) integram junto com o RNA viral linear a RNP de simetria helicoidal. Já as

proteínas M (matriz) e G (glicoproteína) estão associadas ao envelope. Estas cinco proteínas estruturais possuem uma organização entre si que faz com que o vírion possua forma semelhante a um projétil (WUNNER et al., 2013).

A replicação do genoma RNA do RABV apresenta fidelidade limitada, uma vez que a enzima RNA polimerase viral não tem atividade corretiva de inserção de nucleotídeos, fato esse que leva ao desenvolvimento de subpopulações de genomas virais distintos que compartilham uma origem comum. Em decorrência da adaptação viral a determinados hospedeiros animais (reservatórios) ao longo do tempo, os diferentes genomas formam agrupamentos de mutantes com variações comuns (marcadores moleculares específicos), que podem ser classificados como variantes antigênicas (AgV) e/ou linhagens genéticas distintas (OLIVEIRA, 2009).

A caracterização das variantes para a tipificação antigênica ou genética em estudos utilizando a técnica de anticorpos monoclonais (ACM) e análise de sequências nucleotídicas tem sido utilizadas para identificar a diversidade do RABV nos diferentes reservatórios associados de focos epizoóticos (FAVORETTO et al., 2001,2002). No Brasil, o RABV os seus principais reservatórios são de cães domésticos (AgV1 e AgV2), morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (AgV3) e não-hematófagos frugívoros *Artibeus lituratus* (AgV3) e insetívoros (AgV4, AgV6 e sete linhagens genéticas), saguis de tufo branco (*Callithrix jacchus*) e cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) A ocorrência das variantes antigênicas ou linhagens genéticas do RABV nos diferentes animais parece estar relacionada a distinções na patogenicidade e na susceptibilidade da espécie hospedeira (FAVORETTO et al., 2001, 2006).

Todos os mamíferos são susceptíveis a esta enfermidade; no entanto, os principais reservatórios animais pertencem às Ordens *Carnivora* e *Chiroptera*. Outros animais como herbívoros podem atuar como hospedeiros terminais ou acidentais. Estima-se que a cada ano mais de 59.000 pessoas (95% de intervalo de confiança: 25.000-159.000) vão a óbito no mundo, sendo que a maioria das mortes estimadas ocorrem na Ásia (59,6%) e África (36,4%) principalmente em países em desenvolvimento com maior incidência em crianças menores de 15 anos (HAMPSON et al., 2015; KNOBEL et al. 2005).

Contudo, o vírus da raiva (RABV) é considerada uma enfermidade negligenciada pelas autoridades governamentais, isto é um fator agravante, pois pode ser totalmente prevenível através da vacinação de cães e também com a profilaxia da raiva humana pré-exposição em tempo hábil das pessoas expostas (JACKSON, 2013; FOOKS et al., 2014). Como sua evolução costuma ser rápida e seus sintomas variados, a profilaxia pós-exposição do paciente deve ser iniciada imediatamente após a identificação de um agravo sofrido pelo mesmo (BOURHY et

al., 1989; KOTAIT et al., 2009).

E com o quadro de elevada mortalidade nos animais que apesar de apresentar números expressivos, pode ser considerado subestimado, pois a ausência de diagnóstico e subnotificação são frequentes (DACHEUX et al., 2011). Isto se dá pela perda da vigilância que representa um dos principais elementos da negligência, levando a perda de dados da incidência da doença, estimativas imprecisas do impacto econômico e subestimativas da real responsabilidade da raiva no mundo (LÉCHENNE et al., 2016).

A doença é usualmente dividida em três ciclos, sendo estes: o **urbano**, caracterizada pela sua ocorrência em cães e gatos; o **rural** por sua ocorrência em herbívoros, como bovinos e equinos; e o **silvestre**, podendo ser subdividido entre aéreo e terrestre (KOTAIT et al., 2009). O ciclo rural é representado principalmente pela transmissão do RABV para herbívoros pela mordedura do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (BRASIL, 2008).

A importância do *D. rotundus* na América Latina é devido ao fato deste mamífero ser identificado geograficamente do sul do México até ao norte da Argentina. (BRASIL, 2005). Este morcego hematófago foi sugerido pela primeira vez como possível transmissor da raiva no Brasil em 1911, por Antonio Carini ao estudar uma epizootia de raiva em bovinos e equinos, em número elevado de animais (mais 4000 bovinos e 1000 equinos) por prolongado período de 4 anos continuava ainda latente na região no Vale do Itajaí, Santa Catarina. Esta epizootia causou danos consideráveis a época que se iniciou em 1908, pois culminou na morte desses animais. No estado de São Paulo, os primeiros casos de raiva em herbívoros foram descritos em 1935, nos municípios de Ubatuba e Itu (CARNEIRO, 1936).

Em um estudo realizado por De Oliveira et al. (2009) no município de Araguari (MG), no período de 1996 a 2003. No qual se fez um levantamento com relação aos abrigos que os morcegos hematófagos mais utilizavam: casa abandonada, bueiro, caverna, pontilhão, ponte, oco de árvore, usina hidroelétrica, viaduto, paiol, torre, cisterna e forno de carvoeira. Já segundo HILL e SMHIMDT (1984) os mesmos geralmente usam como abrigos túneis, grutas de pedra, bueiros, poços d’água, e mais raramente habitam telhados de casa e ocos de árvores, eles só saem com ausência total de luz ou falta da luz da lua, devido aos seus hábitos serem noturnos, e se forem encontrados de dia podem estar doentes e possivelmente estar raivosos (FLORES-CRESPO et al., 1972).

Isso se deve as constantes alterações ambientais causadas pela atividade humana, (envolvendo o desmatamento) tais como substituição das matas por plantações de monoculturas e pastagens para as criações de animais, tendo possibilitado a instalação de novas populações de morcegos hematófagos (TADDEI et al., 1991). Contudo, existe registros de *D. rotundus* em

áreas urbanas, como São Paulo (SP), Belo Horizonte(MG), Rio de Janeiro(RJ) e Salvador (BA), com ataque as pessoas nessas cidades (UIEDA, 1995; GONÇALVES et al. 2002). Há relato também de 45 casos de raiva humana registrados em 2005, sendo que 42 destes, foram causados por agravos diretos dos morcegos hematófagos (BRASIL, 2005).

O *D. rotundus* é o responsável pela continuidade da transmissão da raiva no ciclo rural (GONÇALVES, 1996; BRASIL, 2009; SESAB, 2019), esta espécie pode trazer enormes prejuízos econômicos para pecuária, sendo o maior transmissor da raiva nos herbívoros, sendo abundante em regiões de exploração agropecuária (ACHA; MÁLAGA-ALBA, 1988). Além, das grandes perdas com os morcegos hematófagos quando transmitem a raiva, também existe a depreciação do couro, enfraquecimento e emagrecimento dos animais, infecções como em equinos podendo ser viróticas:(Encefalite Venezuelana Equina e Febre Amarela), bacterianas (*Salmonella e Shigella*, *Brucella*) e miíases nos ferimentos causados por mordedura. (BREDT, 1996).

No cavalo, essa evidência física de ferida por mordedura por exposição aos morcegos hematófagos tem sido relatada na região da escápula, cabeça e pescoço, que poderia ser explicada pela maior facilidade de apreensão quando os morcegos ficam agarrados pela crina. E a mordedura produzida por *D. rotundus*, para se alimentar, possui formato aproximadamente circular ou elíptico, variando de 3 a 6 mm no seu maior comprimento (SAZIMA, 1978).

Apesar da grande maioria dos casos de raiva em herbívoros ser transmitida por morcegos hematófagos, existem relatos recentes no Brasil desta enfermidade causada por agravos de carnívoros silvestres *Cerdocyon thous* em herbívoros, como os detectados no ano de 2017 no Estado da Bahia (informação verbal)[1]. Já em casos registrados em cavalos na América do Norte, os carnívoros silvestres como por exemplo o guaxinim são os transmissores e reservatórios para o vírus da raiva e são os mais significativos da região. Esses agravos podem ser difíceis de identificar, passando muitas vezes desapercebidos, pois tais feridas causadas pela mordedura podem ser muito pequenas sendo semelhantes a agulhas (GREEN, 1993).

Como a infecção pelo RABV em equinos é considerada um evento de *spillover* viral, pois apesar de integrarem a cadeia epidemiológica da raiva, atuam apenas como animais sentinelas e hospedeiros acidentais ou terminais dessa doença. Assim, a probabilidade de transmissão destes para outros animais é baixa (ACHKAR et al., 2010). Mas a atuação dos cavalos como sentinelas é relevante, visto que a detecção e o isolamento do RABV em morcegos hematófagos não ser fato comum, sendo importantes indicadores da circulação viral em determinada região.

[1] Comunicação pessoal da Sara Araújo Franco Guimarães, LACEN-BA

No entanto, por um período longo a raiva em cavalos foi tida como uma doença de importância menor, devido a maior ocorrência na espécie bovina. Com a evolução dos programas nacionais de controle da raiva bovina na América Latina e a aplicação de vacinas regularmente para estes animais, também a raiva em equídeos começou a aumentar a sua relevância, já que em decorrência do crescimento do número de casos pelo fato da manutenção de seus indivíduos não imunizados ficam assim mais susceptíveis. A ocorrência dos casos de raiva em herbívoros no estado de São Paulo foi dividido pela Comissão Estadual do Programa de Controle da Raiva no ano de 2000 em três áreas classificadas como: endêmica, epidêmica e esporádica. Essa setorização possibilitou maior eficácia nas medidas adotadas para o controle de focos de raiva pela defesa agropecuária do estado (KOTAIT et al., 2010).

Foram divulgados pelo o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), nos períodos de 2004 a 2006 (37 positivos no total de 112 amostras de equinos – 33%) e nos períodos de 2009 a 2011 (47 positivos no total de 217 amostras de equinos – 21,7%) (COSTA et al., 2009, 2015). No intervalo de 2007 a 2012, foram avaliados pelo Instituto Biológico de São Paulo 218 amostras de SNC originárias de equídeos, sendo que 37 (17%) foram positivos (CUNHA et al., 2016). Pimentel et al. (2009) observaram que 22,4% (11/49) dos cavalos com problemas neurológicos provenientes do Nordeste brasileiro eram acometidos com raiva.

Dados do Ministério da Agricultura mostram que no período de 1997 a 2015, foram registrados 3.692 casos de raiva em equídeos (casos laboratoriais associados com casos clínicos) em todo território nacional. Sendo que desses, 756 casos ocorreram no Estado de São Paulo no mesmo período (Quadro 1). De 2000 a 2015, foram identificados como positivos 617 (24,5%) em um total de 2.522 casos de cavalos com manifestações neurológicas em levantamento realizado no Instituto Pasteur (informação verbal)[2].

[2] Informações fornecidas pelo Profº. Dr. Enio Mori em levantamento realizado (2000 a 2015 casos de cavalos com manifestações neurológicas) no Instituto Pasteur/ SP, em janeiro de 2019.

Quadro 1 – Casos de raiva em equino no estado de São Paulo e Brasil e abrigos de morcegos hematófagos em São Paulo

Ano	São Paulo		** Brasil
	*Equinos	**Abrigos de morcegos hematófagos	
1997	27	-	258
1998	37	-	247
1999	44	-	374
2000	212	892	388
2001	76	1083	238
2002	72	2438	236
2003	45	3606	220
2004	21	4248	136
2005	13	3580	185
2006	11	4074	180
2007	9	4130	139
2008	26	2585	133
2009	4	2184	129
2010	6	1670	117
2011	7	1968	142
2012	38	1806	143
2013	27	2079	192
2014	43	4924	128
2015	38	4167	107
2016	27	-	-
2017	49	-	-
2018	57	-	-

Fontes: * Coordenadoria de Defesa Agropecuária De São Paulo - CDA/SP
**Departamento de Saúde Animal –DSA/DAS Mapa

A raiva equina tem sido relatada na maioria dos países do mundo. Esta enfermidade permanece como causa relevante de óbito em cavalos na América do Sul e Central em decorrência dos agravos dos morcegos hematófagos. Nestas regiões, estima-se que a raiva dos herbívoros seja responsável por enormes prejuízos econômicos diretos em decorrência da mortalidade, além dos gastos indiretos que podem ocorrer com a vacinação dos equinos e

bovinos nas áreas de ocorrência de epizootias e na profilaxia pós-exposição (soro-vacinação) de pessoas que mantiveram contato com animais infectados (BRASIL, 2009)

Embora a raiva possa ocorrer em qualquer época do ano, são identificadas tendências sazonais. A maioria dos casos de raiva equina foi observada no final dos meses de verão, quando a densidade das populações de animais selvagens transmissores atinge seu ápice (GREEN et al. 1992; GREEN et al., 1993; GREEN et al., 1997; IRVIN, 1970). Apesar dessa tendência de maior ocorrência nas épocas mais quentes, Green et al. (1992) relataram a ocorrência de casos de raiva equina no inverno do hemisfério norte, sugerindo assim que a raiva possa acontecer em qualquer época do ano.

Segundo a literatura, não foi constatado predileção por gênero, raça ou idade para a raiva em equinos (GREEN et al. 1992; GREEN et al. 1993; IRVIN, 1970). No entanto, Green et al. (1992) observaram que cerca de metade dos equinos estudados eram potros jovens com idade menor ou igual a um ano de idade, sendo que 50% desses animais eram recém desmamados. Isso pode estar relacionado ao fato de que o animal mais jovem tem maior risco de exposição, devido à sua intensa curiosidade e a sua menor capacidade de se defenderem das agressões de animais selvagens.

Como o RABV pode permanecer no local da ferida por períodos prolongados, a duração da incubação é bastante variável. Nos cavalos, esse período é, em geral, de 2 a 9 semanas. Deve salientar-se que o período de incubação, bem como o tempo para o estabelecimento de manifestações, a sequência de sinais clínicos e o tempo de sobrevivência, dependem de diversos fatores, tais como: local de mordedura ou local de exposição em relação a sua proximidade com o SNC; quantidade de vírus inoculado e patogenicidade da estirpe viral. O atraso no desenvolvimento de sinais clínicos tem sido atribuído à “incubação muscular” do vírus, que se replica primeiro no músculo, nas proximidades no local do agravo, antes de migrar para o tecido nervoso (GREEN et al. 1993; HEMACHUDHA et al. 2013).

Três formas da doença são descritas e tradicionalmente estão relacionadas com afecções nas diferentes estruturas do SNC, tais como: 1) “forma furiosa” ou cerebral; 2) “forma silenciosa” ou do tronco encefálico; 3) “forma paralítica” ou da medula espinhal. As formas mais predominantes na raiva em equinos são as duas últimas, nas quais a maioria dos sinais clínicos podem estar sobrepostos, com manifestações extremamente variáveis (SMITH; CLAIRE, 1972; GREEN et al., 1997).

Além disso, diferenças nas manifestações clínicas também podem estar relacionadas com as diversidades entre as variantes antigênicas ou linhagens genéticas do RABV, sendo assim, é mais comum que no casos de raiva paralítica em herbívoros estejam associadas a variantes

antigênicas geralmente isoladas em morcegos hematófagos *D. rotundus* (AgV3) (FAVORETTO et al., 2001, 2006).

Inicialmente, os cavalos infectados podem apresentar parestesia no local da mordedura, geralmente na face (focinho) ou nas extremidades inferiores. O intenso prurido, manifestado pela fricção ou mordida do próprio animal, pode aparecer como automutilação, causando graves lesões. Alguns equinos apresentam algum grau de hiperestesia, dando a impressão de estarem intranquilos, em estado de alerta, com as orelhas eretas e com grande mobilidade, podendo ser confundidos com sintomas de "síndrome cólica" em um determinado momento durante o curso da doença (GREEN et al., 1997; KOTAIT et al., 2008).

A "forma paralítica" da raiva em equinos é distinguida pela manifestação de ataxia e paresia, que frequentemente se inicia nos membros posteriores e progride de maneira ascendente para os membros anteriores. Conforme o avançar da enfermidade, a maioria dos animais desenvolvem hipoalgesia dos membros posteriores, com perda dos tônus da cauda e do esfíncter anal (associar com manifestações de incontinência urinária e tenesmo). Podem também ficar prostrados, com "fraqueza" dos membros posteriores devido a sua dificuldade em se manter em estação. Na fase final, o quadro clínico evolui para decúbito lateral e finalmente coma. Alguns animais em decúbito podem permanecer alertas sem alteração no apetite e com normodipsia, antes de evoluírem à parada respiratória ou cardíaca (SMITH; CLAIRE, 1972; GREEN et al. 1992; GREEN, 1993).

A "forma silenciosa" pode ser caracterizada por sialorréia abundante, paralisia faríngea, paralisia da face e de língua, depressão, anorexia, incontinência urinária e tenesmo (GREEN, 1993; KOTAIT et al., 2008). Já o desenvolvimento da "forma furiosa" da raiva pode estar relacionado com a replicação viral no sistema límbico, que pode resultar na ausência do controle cortical do comportamento. Devido a isso, a manifestação clínica característica seria a agressividade e ataque indiscriminado a objetos, pessoas ou animais. Outros sintomas observados nesta forma de doença são convulsões, cegueira, hiperatividade, fotofobia, hidrofobia e hiperestesia. O animal torna-se extremamente perigoso por causa de seu comportamento imprevisível e violento. Apesar de não ser comum, há relato da predominância desta forma clínica em um surto de raiva em equinos na África do Sul (GREEN, 1993; GREEN, 1997). Em alguns animais podem ter combinação das diferentes formas da doença com a evolução da forma furiosa a paralítica (SMITH; CLAIRE, 1972).

A progressão rápida (aguda) da doença é uma característica da raiva equina quando comparada com os bovinos, sendo um aspecto a ser destacado. O tempo de sobrevida após o início dos sinais clínicos é de aproximadamente 4 a 5 dias; mas em casos raros pode durar até

10 a 15 dias. No entanto, na maioria dos casos relatados há eutanásia antes do quinto dia do início dos sintomas devido a evolução desfavorável ao quadro clínico (GREEN, 1993).

Quadro 2 – Principais manifestações clínica da raiva em equino

Sinais clínicos comuns	Sinais clínicos menos comum
Decúbito	Cabeça pendente ("Head tilt")
Ataxia e paresia	Andar em círculos
Hiperestesia	Bruxismo
Tremor muscular	Cegueira
Claudicação	Paralisia faringeana
Anorexia	Tenesmo
Perda de tônus da cauda e esfincter anal	Sialorréia
Perda da percepção sensorial dos membros posteriores	"Ronco" (Estridor)
Febre (temperatura >38,3^{0}C)	Sudorese
Cólica	Movimentos de pedalagem no decúbto
Depressão	Vocalização Anormal
Convulsão	
Agressividade	
Movimentos de pedalagem no decúbto	

Fonte: Modificado de Green (1993).

Além disso, em decorrência das características de criação peculiares a espécie animal como a proximidade com o proprietário, a eutanásia nos cavalos acometidos com raiva é mais comum, sendo que nos bovinos a evolução para morte natural é um evento mais frequente. Como o diagnóstico *antemortem* da raiva em equinos é clinicamente difícil em decorrência do espectro variável de manifestações, as amostras de SNC devem ser enviadas também para o laboratório para o diagnóstico diferencial com outras encefalopatias, tais como encefalomielite viral equina, mieloencefalite por herpesvírus, febre do Nilo Ocidental, mieloencefalopatia por protozoários, encefalite bacteriana e leucoencefalomalácia, sendo sua confirmação no laboratório de extrema importância (PEIXOTO et al., 2000; CARRIERI et al., 2006; IAMAMOTO, 2011; CUNHA et al., 2016).

Os testes para diagnóstico da raiva devem apresentar alta sensibilidade e especificidade e rapidez na obtenção dos resultados, sendo recomendadas pela OMS (Organização Mundial da Saúde) para tal finalidade as técnicas de imunofluorescência direta (IFD) e de isolamento viral, a qual usualmente podem ser realizados pela inoculação em camundongos ou em cultura de células (DEAN et al., 1996; MESLIN; KAPLAN, 1996).

A IFD depende da habilidade da molécula detectora (usualmente isoticianato de fluoresceína conectada com o anticorpo antirrábico específico formando um conjugado), ligar-

se ao antígeno viral. A análise pelo microscópio de fluorescência das amostras é um método de detecção direta que permite a identificação específica do antígeno viral do RABV pela visualização do sinal resultante da reação do antígeno com anticorpo rapidamente (2 horas) e com um custo reduzido, independentemente da ordem geográfica ou estado do hospedeiro. Essa técnica é considerada uma prova de triagem inicial no diagnóstico em todos os laboratórios do mundo (FOOKS et al. 2009).

O teste de IFD é considerado padrão-ouro no diagnóstico da raiva, devendo ser realizado em um laboratório de referência, apresentar especificidade e sensibilidade diagnósticas altas próximas a 100% (MAYES; RUPPRECHT, 2015). A acurácia do resultado da IFD depende de diversas variáveis, tais como: experiência do examinador, qualidade do conjugado antirrábico, funcionalidade do equipamento incluindo microscópio de fluorescência e qualidade das amostras e dos reagentes utilizados (WHO, 2018). No entanto, o diagnóstico da raiva em amostras de equinos, observa-se sensibilidade diagnóstica na IFD mais baixa (76,6%) quando comparadas com amostras de outras espécies (PEIXOTO et al., 2000).

Os corpúsculos de Negri, que são inclusões intracitoplasmáticas das RNPs virais encontradas mais comumente nos neurônios presentes no hipocampo e nas células de Purkinje no cerebelo, são consideradas patognomônicas para a doença. No entanto, eles não estão presentes em todos os casos de raiva em equinos. Sabe-se também que em equinos acometidos por raiva, cerca de 50% das amostras não apresentaram formação destes corpúsculos de inclusão, fato que pode corroborar com a dificuldade de identificação viral, podendo consequentemente gerar resultados falsos negativos (GREEN et al., 1992; PEIXOTO et al., 2000). Como a progressão da doença nos cavalos é mais rápida quando comparada com a raiva nos bovinos, uma vez estabelecida a fase neurológica os equinos sobrevivem apenas 3 a 4 dias, a formação e consequente visualização dos corpúsculos de Negri pode estar diminuída em intensidade nesta espécie (PEIXOTO et al., 2000).

Estes corpúsculos são mais propensos a serem observados em cavalos que sobrevivem por um período maior que quatro dias após o início dos sinais clínicos. Estas inclusões também podem variar em número, tamanho e morfologia, dependendo do estágio da doença clínica. Diversos autores observaram diferenças na distribuição viral nas diferentes estruturas de SNC de equinos, com maior detecção em amostras de tronco encefálico e medula espinhal (SILVA et al., 1974; CARRIERI et al., 2006; BASSUINO et al., 2016). Sabe-se que a detecção do antígeno rábico no SNC somente é possível quando o RABV atinge altos títulos após a replicação viral (TRIMARCHI; NADIN-DAVIS, 2007). Portanto, em algumas situações nas quais as concentrações virais encontram-se abaixo do limiar de detecção das técnicas utilizadas

em algumas estruturas como córtex cerebral, cerebelo e hipocampo poderia ocorrer diminuição da sensibilidade. Devido a essas intercorrências no diagnóstico o exame direto dos corpúsculos de Negri pela coloração de *Sellers,* deixou de ser uma prova recomendada pela OMS e Organização Mundial da Saúde Animal (OIE).

O tronco encefálico composto por (ponte, bulbo e mesencéfalo) é considerada a estrutura mais relevante para o diagnóstico da raiva independentemente da espécie animal envolvida. De modo geral, os antígenos do RABV se encontram disseminados por todo o SNC na maioria dos animais positivos para raiva. No entanto, em situações nas quais os animais apresentam baixa carga viral em especial nos animais eutanasiados, há uma tendência a ter a detecção do antígeno viral mais frequente no tronco cerebral do que em outras regiões do encéfalo. Além disso, o exame de uma secção transversal completa do tronco cerebral é importante devido à possibilidade de disseminação unilateral do vírus, particularmente em animais herbívoros (WHO, 2018).

Existem poucos relatos na literatura da transmissão da raiva do cavalo para humano, sugerindo que este evento seja raro. No entanto, o risco associado à exposição de um animal raivoso deve ser levado em consideração, especialmente em regiões endêmicas. Na Etiópia, há relato de um caso humano de raiva transmitido por jumento (FEKADU, 1982). De modo similar, no Brasil há duas descrições de transmissão em humanos por equídeos raivosos: um caso no ano de 1992 no município de Primeira Cruz-MA e outro no ano de 1985 (ARAÚJO, 2002; SCHNEIDER, 1990).

Poucos trabalhos testaram a presença do vírus nas glândulas salivares em cavalos com raiva. Silva et al. (1974) em estudo com dois animais com IFD positiva em estruturas como medula e bulbo, observaram ausência da presença viral nas glândulas salivares. Carrieri et al. (2006) investigaram a presença viral na glândula salivares em 50 cavalos naturalmente infectados com RABV e encontraram resultados positivos, em apenas dois animais (4%). Vale salientar que estes dois animais também apresentavam positividade pela IFD em todas as cinco regiões de SNC (tronco encefálico, medula, córtex, cerebelo e hipocampo) estudadas, esses trabalhos relataram que o RABV é eliminado na saliva, mas somente naqueles animais que se apresentaram positivos na IFD supostamente com altas concentrações virais no tecido nervoso. No entanto, seria arriscado basear o diagnóstico somente a partir de amostras de saliva ou *swab* orofaríngeo, visto que a eliminação viral por esta secreção deve ser intermitente na espécie equina (HEMACHUDHA et al., 2002; LEUNG et al., 2007).

Portanto, os resultados negativos de RT-PCR das amostras de saliva para detecção do RNA viral devem ser interpretados com cautela. O risco maior de transmissão ocorre em situações

potenciais de contágio quando ocorre uma estreita relação homem-equino, como tratadores e veterinários no manejo diário, tais como contato da saliva do animal infectado com a mucosa dos olhos, nariz e boca ou com uma ferida ou abrasão na pele. É postulado que a ausência do antígeno rábico detectado pela IFD no SNC de animais poderia excluir a possibilidade da presença viral na saliva, sendo assim, o risco de transmissão neste caso seria ausente tornando assim a profilaxia pós-exposição desnecessária (SMITH, 1996). Sabe-se que somente após a replicação no SNC que o RABV se dissemina de modo centrifugo para as glândulas salivares e outros tecidos não neurais (TRIMARCHI; NADIN-DAVIS, 2007).

A identificação do RABV por isolamento viral em camundongos (IVC) em equinos, continua sendo o método confirmatório mais utilizado no caso do diagnóstico da raiva e é o método recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no Brasil. Trata-se de uma técnica de maior sensibilidade diagnóstica (93,7%), quando comparada a IFD (PEIXOTO et al., 2000). No entanto, como anteriormente comentado, em virtude da baixa concentração da carga viral, tem-se resultados de isolamento viral mais bem-sucedidos quando realiza-se inoculação em camundongos neonatos de 3 dias de idade (WHO, 2018).

Webster (1987) desenvolveu o isolamento viral em cultura celular IVCC para o isolamento do RABV em células de neuroblastoma murino (N2a) comparando tais resultados com os obtidos a partir do isolamento viral em camundongos (IVC). O teste com células se mostrou tão sensível à infecção pelo vírus quanto o IVC. A técnica de IVCC se mostrou com menor custo e passou a ser utilizada em substituição à técnica de IVC.

As técnicas de IVCC e IVC são provas de detecção indireta baseadas na propagação e posterior isolamento viral em sistema biológico, geralmente realizadas como provas confirmatórias dos resultados negativos ou inconclusivos obtidos pela IFD. Essas técnicas convencionais de amplificação viral podem requerer um tempo de resposta de aproximadamente 4 dias (para o IVCC) e 28 dias (para o IVC) (FOOKS et al., 2009; WHO, 2018).

De todos os métodos moleculares que investigam a detecção do RNA do RABV, testes baseados na transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) são os mais frequentemente adotados (SACRAMENTO et al, 1991). Apesar da sua alta sensibilidade, principalmente na *Nested* ou *Hemi-Nested* RT-PCR direcionada para gene codificador da nucleoproteína (N) – região altamente conservada entre as várias técnicas virais, as técnicas moleculares convencionais, baseadas em gel apresentam algumas desvantagens, tais como: risco de contaminação cruzada, alto custo em relação as técnicas tradicionais, alto tempo consumido (>2 dias), elevada carga de trabalho com várias etapas e necessidade de pessoal

capacitado (HANLON & NADIN-DAVIS, 2013; FOOKS et al., 2009). Devido a isso, essa técnica não deve ser utilizada em material encefálico fresco *post-mortem* provenientes dos animais e humanos suspeitos de raiva. No entanto, a RT-PCR pode ser utilizada em amostras clínicas coletadas de humanos suspeitos de raiva (como saliva, liquor, folículo piloso da nuca) para diagnóstico *antemortem* (DACHEUX et al., 2010; FISCHER et al, 2014).

Após esse procedimento gerar uma amplificação positiva, a caracterização da sequência do produto de RT-PCR por meio de análises filogenéticas pode elucidar o tipo de variante viral e área geográfica aonde o vírus circula (FOOKS et al., 2009). Adicionalmente, a RT-PCR possui a vantagem de ser utilizado para detecção do ácido nucleico em amostras autolisadas, situações nas quais os testes convencionais podem ser ineficazes (DAVID et al., 2002).

Outra situação na qual o desempenho da IFD pode estar diminuído, é quando há baixa carga viral, assim as diferentes provas moleculares também podem ser utilizadas como técnicas confirmatórias. No entanto, situações com resultados discordantes entre diferentes técnicas podem ser problemáticos, pois a distinção entre os resultados falso negativos ou falso positivos pode ser um processo complexo (HANLON & NADIN-DAVIS, 2013). A RT-PCR ainda não é adotada como teste diagnóstico primário para a raiva em amostras de SNC no *postmortem* devido a problemas na acurácia do diagnóstico, habilidade do laboratório no desempenho dos ensaios moleculares; e incompleta validação dos ensaios (GIGANTE et al., 2018). Além disso, a RT-PCR requer uma etapa adicional de sequenciamento nucleotídico para confirmar resultados positivos (FOLKS et al, 2009; WACHARAPLUESADEE et al., 2010).

O desenvolvimento de técnicas de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) permite a quantificação do RNA viral e garante um método rápido e sensível do ponto de vista analítico (permitindo a detecção de pequenas quantidades de RNA viral) (FOOKS et al., 2009; COERTSE et al., 2010). Com o risco reduzido de contaminação devido ao sistema "tubo fechado" e não requerendo o processamento pós amplificação (eletroforese). A RT-qPCR pelo sistema *SYBR Green* de detecção de RNA do vírus da raiva parece ser bastante promissor (NAGARAJ et al., 2006; HAYMAN et al., 2011), mas requer extremo cuidado para assegurar a especificidade analítica dos resultados (NADIN-DAVIS et al., 2009). Por outro lado, o sistema de RT-qPCR utilizando a sonda de hidrólise fluorogênica 5' exonuclease (*TaqMan),* assegura uma alta especificidade analítica em decorrência da reação de hibridização intrínseca da sonda (HUGHES et al., 2004; WAKELEY et al., 2005; WACHARAPLUESADEE et al., 2008; NADIN-DAVIS et al., 2009). Entretanto a significante diversidade de sequências entre as diferentes variantes virais torna difícil o desenvolvimento de um único, robusto e simples ensaio para diagnóstico da raiva (GIGANTE et al., 2018). Incompatibilidade (*mismatches)*

entre o alvo e a sonda pode levar a resultados falsos negativos ou diminuição da sensibilidade (MANI et al., 2014).

Em decorrência do que foi mencionado, os conhecimentos gerados com o estudo utilizando técnicas moleculares na detecção do RABV em glândulas salivares de equinos naturalmente infectados associado com a avaliação da intensidade da distribuição viral (neuroinvasividade) nas diferentes estruturas de SNC, poderiam elucidar pontos importantes da patogênese viral, assim como auxiliar na implantação de ferramentas adicionais no diagnóstico da raiva em equinos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Verificar a neuroinvasividade e carga viral do vírus da raiva (RABV) em amostras de SNC de equinos naturalmente infectados provenientes do setor diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur.
- Verificar a presença do vírus da raiva (RABV) em glândulas salivares de equinos naturalmente infectados provenientes do setor diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar e avaliar a distribuição do antígeno viral da raiva em amostras de SNC (tronco encefálico, tálamo, cerebelo, córtex, hipocampo e medula espinhal) de equinos naturalmente infectados pela técnica de imunofluorescência direta (IFD).
- Detectar e avaliar a distribuição do RNA viral da raiva em amostras de SNC (tronco encefálico, tálamo, cerebelo, córtex, hipocampo e medula espinhal) e glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual) de equinos naturalmente infectados pela técnica de RT-PCR (transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase) convencional.
- Detectar, quantificar e avaliar a distribuição do RNA viral da raiva em amostras de SNC (tronco encefálico, tálamo, cerebelo, córtex, hipocampo e medula espinhal) e glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual) de equinos naturalmente infectados pela técnica de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR).
- Comparar a sensibilidade diagnóstica das técnicas de IFD, IVCC (isolamento viral em cultivo de células), RT-PCR e RT-qPCR em amostras de SNC de equinos naturalmente infectados pelo RABV.

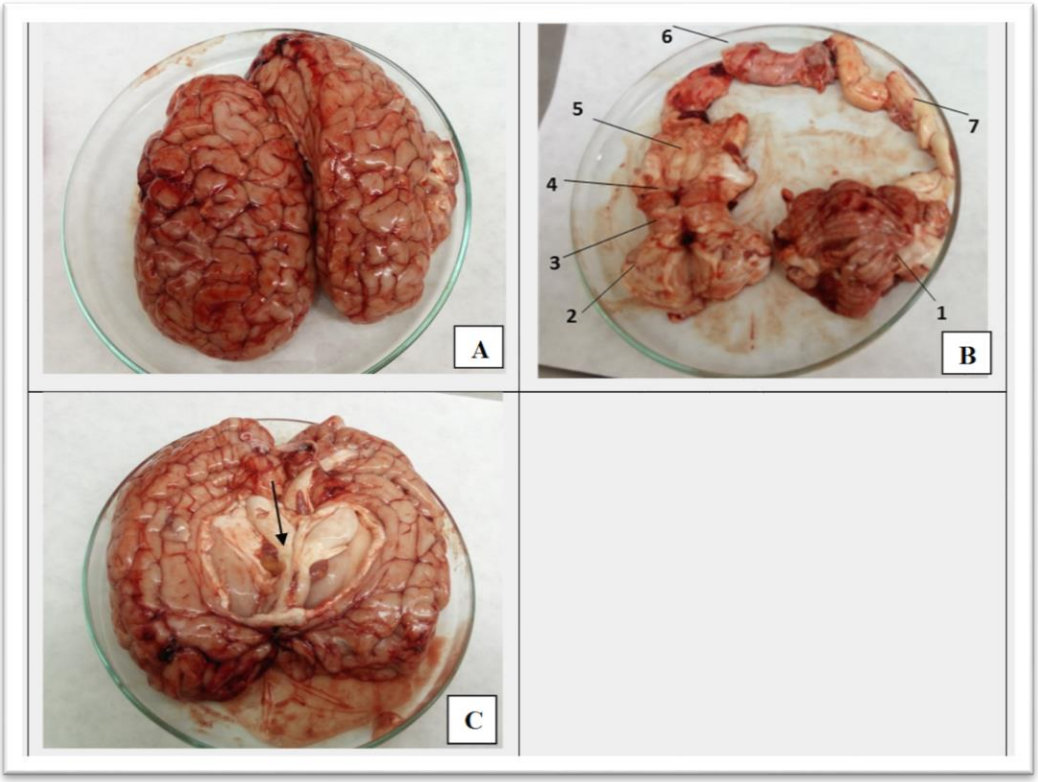
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

O material utilizado para o estudo foi o sistema nervoso central de 80 equinos encaminhados para a Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur, São Paulo (Anexo A), provenientes de municípios do Estado de São Paulo (Quadro 3), no período de abril de 2017 a abril de 2018. As amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento da observação das mesmas e identificação das diferentes porções encaminhadas [cerebelo, tronco encefálico (bulbo, ponte e mesencéfalo) tálamo, hipocampo, córtex e medula cervical e medula lombar] (figura 1) e glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual), totalizando 540 fragmentos. A distribuição dos fragmentos pode ser observada no Tabela 1.

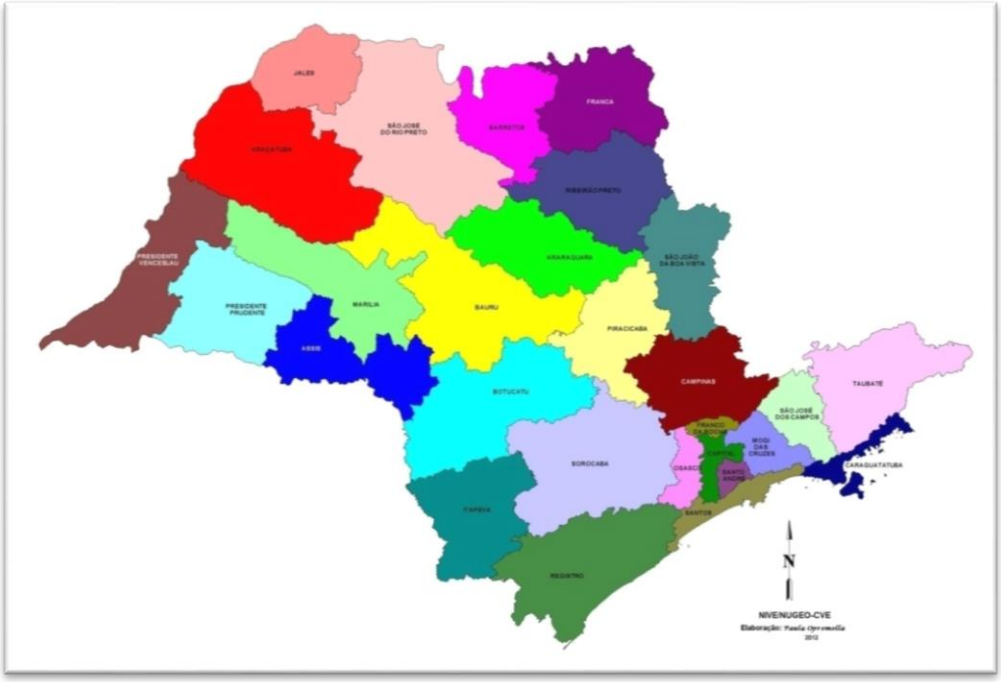
As amostras originárias de municípios do Estado de São Paulo foram divididas de acordo com seus Grupos de Vigilância Epidemiológica (GVE), a representação dos mesmos pode ser observada na figura 2.

Figura 1 – Fotografia representativa de encéfalo equino recebido na Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur/SP



Fonte: Souza, T.C.P.(2019).
Legenda: A) Encéfalo antes do início do processamento com aspecto sanguinolento, indicando a presença de hemorragia. B) Observa-se as seguintes estruturas de SNC: 1) cerebelo, 2) tálamo, 3) meséncefalo, 4) ponte, 5) bulbo, 6) medula cervical e 7) medula lombar. C) Em destaque hipocampo ou corno de Amon.

Figura 2 – Mapa do Estado de São Paulo com as subdivisões em Grupo de Controle Epidemiológico (GVE)



Fonte: Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE).

Quadro 3 – Municípios de origem das amostras de SNC de equinos do Estado de São Paulo encaminhados para a Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Pasteur/SP no período de abril de 2017 a abril de 2018

GVE	Municipios do Estado de São Paulo	
VII - Santo André	Santo André	1
	São Bernanrdo do Campo	1
	Subtotal	2
XVII - Campinas	Águas de Lindoia	1
	Campinas	1
	Indaiatuba	4
	Morumgaba	4
	Monte Mor	4
	Serra Negra	1
	Socorro	2
	Subtotal	17
XVIII - Franca	Franca	3
	Pedregulho	1
	Subtotal	4
XIX - Marília	Bastos	1
	Marília	1
	Subtotal	2
XX - Piracicaba	Capivari	2
	Itirapina	2
	Leme	1
	Rafard	2
	Rio Claro	1
	Subtotal	8
XXIV - Ribeirão Preto	Jurucê	1
	Ribeirão Preto	1
	Subtotal	2
XXVI - São João da Boa Vista	Espírito Santo do Pinhal	10
	Itapira	11
	Mogi Guaçu	2
	Moji Mirim	1
	São João da Boa Vista	1
	Subtotal	25
XXVII - São José dos Campos	Monteiro Lobato	1
	Subtotal	1
XXVIII - Caraguatatuba	Caraguatatuba	4
	Subtotal	4
XXXI - Sorocaba	Itapetiniga	1
	Subtotal	1
XXXII - Itapeva	Bom Sucesso do Itararé	2
	Guapiara	1
	Itararé	1
	Subtotal	4
XXXIII - Taubaté	Taubaté	9
	Tremebé	2
	Subtotal	11
TOTAL		**80**

Fonte: Souza, T.C.P. (2019).

Tabela 1 – Distribuição dos fragmentos de SNC de equinos do Estado de São Paulo encaminhados para a Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Pasteur/SP no período de abril de 2017 a abril de 2018

Estruturas	Recebidas/Equinos
Bulbo	63/80 (78,75%)
Cerebelo	64/80 (80,0%)
Córtex	79/80 (98,75%)
Glândulas Salivares *	4/80 (5,0%)
Glândulas Parótida	11/80 (13,75%)
Glândulas Submandibular	11/80 (13,75%)
Hipocampo	75/80 (93,75%)
Médula Espinhal *	4/80 (5,0%)
Médula Cervical	10/80 (12,5%)
Medula Lombar	10/80 (12,5%)
Mesencéfalo	71/80 (88,75%)
Ponte	65/80 (81,25%)
Tálamo	71/80 (88,75%)
Tronco encefálico *	2/80 (2,5%)

Fonte: Souza, T.C.P. (2019).
Legenda: *****Amostras que não foram identificadas as estruturas.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Colheita de amostras

As amostras utilizadas foram processadas para fins diagnósticos (IFD e isolamento viral), sendo posteriormente os fragmentos separados para fins de armazenamento de duas formas: 1) para a fixação em formol a 10% tamponado; 2) para o congelamento em *freezer* a -80ºC.

Os fragmentos de SNC coletados para a fixação em formol foram mantidos em coletores universais a temperatura ambiente por um período de 24 a 72 horas. Em seguida, os fragmentos foram seccionados para o armazenamento em cassetes histológicos para que pudessem ser inclusos em blocos de parafina para posterior processamento histológico.

As porções de SNC foram também submetidas ao congelamento -80ºC para posterior processamento para provas moleculares como RT-PCR e RT-qPCR.

3.2.2 Técnica de Imunofluorescência Direta (IFD)

Para a confirmação da presença do RABV, as lâminas foram confeccionadas com impressões de fragmentos do SNC [encéfalo (cerebelo, tronco encefálico – bulbo, ponte e mesencéfalo, tálamo, hipocampo, córtex e medula cervical e medula lombar)] foram

submetidas à técnica de IFD para pesquisa de antígeno viral, de acordo com a técnica descrita por Dean et al. (1996). A IFD consiste na adição da suspensão de anticorpo monoclonal anti-RABV, previamente conjugado com isoticianato de fluoresceína (DFA monoclonal anti-rabies conjugate, *Millipore*). A leitura foi realizada no microscópio de fluorescência ZEISS SCOPE A1-AX10, no setor de virologia do Laboratório de diagnóstico de raiva do Instituto Pasteur/ SP.

As lâminas de IFD foram realizadas por meio de *imprint* dos fragmentos, ou seja, pela impressão dos mesmos em lâminas de microscopia. Para cada lote foi incluída uma lâmina de controle negativo obtida pelo *imprint* de SNC de camundongos sadios e duas lâminas de controle positivo, obtidas por intermédio da impressão de amostras sabidamente positivas para o RABV. As amostras foram fixadas em acetona P.A. 100% (Merck) a -20ºC por 45 minutos.

A leitura das lâminas foi realizada de modo a classificar a intensidade de fluorescência da marcação antigênica do RABV. A determinação das cinco classes que refletem a intensidade das reações foi realizada segundo critérios utilizados por Carrieri et al. (2006), sendo: classe 0 (-), a ausência de inclusões antigênicas; classe 1 (+), com rara presença de antígenos, com apenas 1 a 3 pequenas inclusões; classe 2 (++), quando há presença de campos negativos e escasso número de inclusões; classe 3 (+++), quando há uma distribuição homogênea de antígenos, mesmo tendo campos negativos; e classe 4 (++++), quando ocorrer distribuição homogênea de antígenos, porém sem campos negativos (CARRIERI et al. 2006).

3.2.3 Preparo da suspensão para isolamento viral

Para o preparo da suspensão da suspensão foram utilizados *pool* de fragmentos de SNC [(cerebelo, tronco encefálico – bulbo, ponte e mesencéfalo -, tálamo, hipocampo, córtex e medula cervical e medula lombar)]. As porções foram maceradas e posteriormente adicionadas com diluente (40 mL de soro fetal bovino Gibco®, 2 mL de antibiótico + antifúngico Sigma®, 17 g NaCl Merck®e água destilada q.s.p. 2000 mL) na proporção de 20% de amostra e 80% de diluente. O macerado foi mantido sob refrigeração por pelo menos 30 minutos, sendo então centrifugado a 1.500 X *g* por 30 minutos em centrífuga previamente refrigerada a 4ºC (*Heraeus egafuge 40R Centrifuge*® - Thermo Scientific). O sobrenadante foi separado e mantido a -20ºC até o momento de o isolamento viral em cultivo celular.

3.2.4 Isolamento viral

O isolamento viral em cultura de células (IVCC) foi realizado pelo setor de virologia do laboratório de diagnóstico de raiva do Instituto Pasteur/SP e os resultados obtidos foram utilizados para compor casuística.

O IVCC foi utilizado a linhagem de Neuroblastoma murino N2A e a técnica descrita por Webster e Casey (1996), modificada por Castilho et al. (2007), em placas com 96 orifícios de fundo chato. A leitura da reação foi realizada em microscópio invertido ZEISS OBSERVER A1-AX10 de fluorescência, com lâmpada HBO-100, com aumento de 200X.

3.2.5 Extração RNA total

3.2.5.1 Glândulas salivares

Com a utilização de um pistilo e pequena quantidade de areia estéril, procedeu-se à maceração das glândulas salivares e preparo da suspensão a 20%, que foi em seguida centrifugada a 1500 X g., durante 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4ºC (*Heraeus egafuge 40R Centrifuge® - Thermo Scientific*) e coletado o material sobrenadante. Para a extração do RNA viral foi utilizado o *MagMAX^{tm} CORE Nucleic Acid Purification Kit* (*ThermoFisher Scientific®)* seguindo o protocolo do fabricante. As amostras extraídas foram armazenadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL a -80ºC até o momento do uso.

3.2.5.2 Sistema Nervoso Central e Glândulas salivares

Para as amostras positivas a extração de RNA de aproximadamente 30mg de cada estrutura de SNC e glândulas e para as amostras negativas foi realizado um *pool* de todos os fragmentos com aproximadamente 30 gramas, extraiu-se utilizando TRizol Reagent *(Invitrogen® Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA), seguindo protocolo determinado pelo fabricante. As amostras extraídas foram armazenadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL a -80ºC até o momento do uso.

3.2.6 Transcrição reversa – síntese do DNA complementar

A transcrição reversa para DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir do RNA total utilizando-se o kit *Super Script™II Reverse Transcriptase* (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Nesta etapa foi feito um “mix” de reagentes,

contendo, por amostra, 5µL de *primer* senso (21G) e 5 µL de *primer* antissenso (304) na concentração de 10 µM (Quadro 4), 6 µL de dNTP (mix de 10mM – 2,5mM de cada: dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 8 µL de 5×*First-Strand Buffer*, 4 µL de ditiotreitol 0,1 M (DTT), 1 µL de *SuperScript™III RT* (200 U/µL), 1 µL de RNAse OUT 40U/µL e 12 µL de água ultrapura. Em seguida, 5 µL de RNA foram adicionados ao tubo de reação. As amostras foram colocadas em termociclador (*BIOER XP Cycler*) a 42°C por 60 minutos para extensão dos oligonucleotídeos iniciadores. Ao final da reação de transcrição, as amostras de cDNA foram armazenadas em *freezer* –20°C.

Quadro 4 - Relação de oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados na RT-PCR para a identificação do RABV direcionados à região do gene codificador da proteína N e as respectivas regiões de hibridização

Primer	Sentido	Sequência (5'-3')	Região
21G	senso	ATGTAACACCTCTACAATG	55-73
304	antissenso	TTGACGAAGATCTTGCTCAT	1514-1533
504	senso	TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACT	1286-1317

Fonte: Orciari et al., (2001).

3.2.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional para detecção do ácido nucléico do RABV

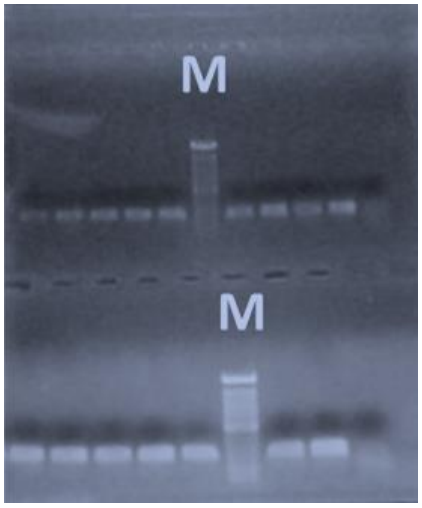
Após a obtenção do cDNA, foi realizada a PCR convencional para detecção do RABV com *primers* 504 em associação com o *primer* 304 (amplicon de 248 pb de tamanho), direcionados à região do gene codificador da proteína N (Figura 3). A amplificação foi realizada em um termociclador (*BIOER XP Cycler*) em uma reação com volume final de 50µl, contendo 0,5-1,0µg de cDNA, 1x tampão de PCR (50mM KCl, 20mM Tris-HCl, pH 9,0), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* senso e antissenso (504 e 304), 1,5mM de $MgCl_2$, 2,5U de *Taq DNA polimerase* platinum (*Invitrogen® Life Technologies*) e água ultrapura q.s.p. (*Invitrogen® Life Tecnhologies*). As condições de tempo e temperatura para cada ciclo da PCR estão descritas no quadro 5.

Quadro 5 - Condições de temperatura e tempo para os ciclos da PCR convencional para amplificação do gene codificador da proteína N do RABV

Ciclo	Temperatura (ºC)	Tempo
1 ciclo	94 ºC–Denaturação	5 minutos
35 ciclos	94 ºC–Denaturação	45 segundos
35 ciclos	55 ºC Hibridização	45 segundos
35 ciclos	72 ºC Extensão	2 minutos
1 ciclo	72 ºC Extensão	10 minutos

Fonte: Orciari et al., (2001).

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Produtos amplificados com tamanho de 248 pb obtidos com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a região do gene do RABV que codifica a nucleoproteína (N). M: marcador de tamanho de 100 pb



Fonte: Souza, T.C.P. (2019).

3.2.8 Sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger

Com o intuito de confirmar a identidade viral que apresentaram resultado negativo na IFD e que apresentaram no presente estudo resultado positivo nas técnicas moleculares (RT-PCR convencional e PCR em tempo real), foi realizado o sequenciamento pelo método de Sanger.

Os produtos de PCR de RABV foram purificados com o kit GFX PCR DNA *gel band purification* (GE *Healthcare Bio-Sciences*) conforme as instruções do fabricante. A qualidade da purificação e quantificação foi realizada visualmente com o *Low Mass* DNAS Ladder (*Invitrogen Life Techonlogies*) por meio de uma corrida eletroforética em gel de agarose 2% com 5µl de PCR purificado, obtendo-se a concentração em ng/µl.

A reação de sequenciamento dos produtos de PCR foi realizada segundo o método enzimático de terminação em cadeia ou dos didesoxinucleotídeos com *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* (*Applied Byosystems*). Essa reação foi realizada em termociclador (*BIOER XP Cycler*) com volume final de 20µl, composta de 4µl de *BigDye* 3.1, 4µl de 5× tampão de sequenciamento, 4pmol de cada *primer* - senso e anti-senso - (304 e 504) para o gene N em reações separadas, DNA-alvo (10ng) e água ultra-pura q.s.p. As condições de tempo e temperatura para os ciclos foram as seguintes: 35 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, com temperatura de rampa de 1°C por segundo entre cada etapa. A seguir, a purificação da reação de sequenciamento foi realizada por S*ephad*ex™ G-50 fine (GE Healthcare Bio-Sciences), em placas com filtro Multiscreen HV com 96 orifícios. Após essa etapa, as sequências de DNA foram determinadas pelo sequenciador automático ABI 3130 *genetic analizer* (*Applied Byosystems*) de acordo com as instruções do fabricante.

Para cada um dos nucleotídeos nos eletroferogramas gerados para as sequências senso e anti-senso de cada amostra foram atribuídos escores pelo aplicativo *Phred* (http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/), sendo utilizadas as posições que apresentaram nucleotídeos com índice maior que 20.

Os nucleotídeos com índice *Phred* igual ou menor a 20 foram conferidos manualmente com o programa *Chromas* versão 2.31 (© 1998-2002 Technelsiumm Pty LTD) para busca de erros de interpretação e discrepâncias entre as fitas sequenciadas.

A sequência dos nucleotídeos consenso final de cada amostra foi obtida com o aplicativo CAP-contig do programa *Bioedit* versão 7.0.5.3 (©1997-2001 Tom Hall), sendo a mesma submetida ao *BLAST* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para confirmação do sequenciamento.

3.2.9 Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (qPCR) pelo sistema SYBR Green

As sequências de oligonucleotídeos iniciadores *primers* senso (504) e antissenso (304) pelo sistema *SYBR Green* foram utilizadas para detecção do ácido nucleico do RABV nas amostras de SNC de equinos (Quadro 4). Para a realização da RT-qPCR foi utilizada placa de 96 orifícios *MicroAmp®Optical 96 well Reaction Plate*, e em cada orifício foram distribuídos 20µL de mix contendo 3,25µL de água livre de nucleases, 12,5µL de *2X SYBR® Green PCR Master Mix* e 0,25µL de cada *primer* senso e antissenso (504 e 304) a 10µM. Após o *mix* ser distribuído nos orifícios, 5µL de cDNA de cada amostra foram adicionados, totalizando um volume final de

25µL. Em cada placa foram adicionados controles positivos, 2 controles negativos (água ultrapura).

Cada amostra foi analisada em duplicata, utilizando placa de 96 orifícios *MicroAmp® Optical 96 well Reaction Plate.* A placa foi colocada no aparelho de PCR em tempo real *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* e submetida aos ciclos descritos no quadro 6. Os resultados foram analisados no 7500 Software v.2.0.5.

Quadro 6 – Condições de temperatura e de tempo selecionadas para cada ciclo da RT-PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green para amplificação do gene codificador da proteína N do RABV

Etapas do programa	Número de Ciclos	Temperatura (ºC)	Tempo
Ativação enzima Amplitaq Gold	1 ciclo	95ºC	10 minutos
Desnaturação	40 ciclos	95ºC	15 segundos
Hibridização e extensão	40 ciclos	60ºC	1 minuto
	1 ciclo	95ºC	15 segundos
Curva de dissociação	1 ciclo	60ºC	1 minuto
	1 ciclo	95ºC	15 segundos

Foram consideradas positivas pela RT-qPCR as amostras que apresentarem ciclo de quantificação (Cq) <35. Além disso, a confirmação desta positividade deu-se pela temperatura de *melting* obtida na curva de dissociação.

Quando as amostras apresentaram o Cq>35 ou Cq<40 foram consideradas de resultado inconclusivo, sendo feita a repetição das reações. Já quando as amostras apresentarem Cq>40, foram consideradas negativas.

3.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.3.1 Cálculo da Especificidade e Sensibilidade diagnósticas

A avaliação da sensibilidade e especificidade diagnóstica das técnicas empregadas (IFD, IVCC, RT-PCR e RT-qPCR) foi calculada a partir da relação entre positividade e negatividade nas amostras de SNC de equinos. Para tanto foram utilizados os seguintes cálculos:

$S_{teste}=P_{teste/}P_{total}$, sendo S_{teste}= sensibilidade diagnóstica de determinada técnica (IFD, IVCC, RT-PCR e RT-qPCR), $P_{teste=}$ positividade de determinada técnica e $P_{total=}$ positividade total (considerando os resultados de todas as técnicas).

$E_{teste}=N_{teste/}N_{total}$, sendo E_{teste}= sensibilidade diagnóstica de determinada técnica (IFD, IVCC, RT-PCR e RT-qPCR), $N_{teste=}$ negatividade de determinada técnica e $N_{total=}$ negatividade total (considerando os resultados de todas as técnicas).

Para que o equino fosse considerado positivo, o mesmo deveria possuir esse resultado confirmatório em pelo menos duas técnicas. Na presença de apenas um único teste positivo nas técnicas ainda não recomendadas pela OMS para diagnóstico *postmortem* da raiva, o resultado foi considerado como discordante e na ausência de comprovação da especificidade por outra técnica foi classificada como falso positivo.

3.3.2 Coeficiente de Concordância de *Kappa*

A concordância entre os resultados das técnicas de IFD, IVCC, RT-PCR e RT-qPCR foi calculada por meio do Coeficiente de Concordância de *Kappa* (κ). O valor de κ situa-se entre -1 e 1, sendo: $\kappa < 0$ concordâncias menor que a obtida ao acaso, $\kappa = 0$ concordância igual à obtida ao acaso, $\kappa > 0$ concordância maior que a obtida ao acaso e $\kappa = 1$ concordância perfeita. São sugeridos os seguintes níveis quantitativos de significância para o valor de κ: foram considerados os valores: < que 0,20 como de concordância pobre; entre 0,21 e 0,40 como concordância discreta; entre 0,41 e 0,60 concordância moderada; 0,61 e 0,80 concordância boa ou substancial; valores maiores 0,81 concordância excelente (LANDIS; KOCK, 1977).

Para o cálculo do índice de *Kappa*, utilizou-se a fórmula:

$$\kappa = \frac{po - pa}{1 - pa}$$

Onde:

$$po = \frac{A + D}{N} \text{ (proporção observada de concordância)}$$

$$pa = \frac{[(A+B)x(A+C)]+[(C+D)x(B+D)]}{N^2} \text{ (proporção esperada de concordância pelo acaso)}$$

4 RESULTADOS

Foi observado que das 80 amostras de SNC de equinos analisadas, 25 apresentaram diagnóstico positivo nas diferentes técnicas realizadas, o que demonstrou uma positividade de 31,25%. Somando-se municípios de origem das amostras positivas, foi possível observar que 36,3% (12/33) dos municípios de São Paulo que encaminharam amostras para o Instituto Pasteur de São Paulo possuíam a circulação do vírus entre os equinos (Tabela 2).

Os positivos nas diferentes técnicas originários de municípios dos estados de São Paulo estão demonstrados tabela 2. A maioria dos animais positivos 38,1% (8/25) estão localizados na região de São João da Boa Vista. Também foram observados números elevados de casos nos municípios que estão localizados nas regiões: Campinas 24% (6/25), Piracicaba 20% (5/25) e Taubaté 20% (5/25) apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Municípios de origem das amostras de SNC de equinos positivos do Estado de São Paulo encaminhados para a Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Pasteur/SP no período de abril de 2017 a abril de 2018

GVE	Municipios do Estado de São Paulo		
XVII - Campinas	Águas de Lindoia	1	1/1 (100%)
	Indaiatuba	2	2/4 (50%)
	Monte Mor	2	2/4 (100%)
	Socorro	1	1/1 (100%)
	Subtotal	6	6/10 (60%)
XX - Piracicaba	Capivari	2	2/2 (100%)
	Itirapina	1	1/1 (100%)
	Rafard	2	2/2 (100%)
	Subtotal	5	5/5 (100%)
XXVI - São João da Boa Vista	Espírito Santo do Pinhal	7	7/10 (70%)
	Itapira	1	1/11 (90%)
	Subtotal	8	8/21 (38,1%)
XXXII - Itapeva	Itararé	1	1/1 (100%)
	Subtotal	1	1/1 (100%)
XXXIII - Taubaté	Taubaté	3	3/9 (33,3%)
	Tremembé	2	2/2 (100%)
	Subtotal	5	5/11 (45,4%)
TOTAL		**25**	25/80 (31,2%)

Fonte: Souza, T.C.P. (2019).

Dos animais positivos foram separadas diferentes porções do SNC [cerebelo, tronco encefálico (bulbo, ponte e mesencéfalo) tálamo, hipocampo, córtex e medula cervical e medula lombar] e glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual), totalizando 166 fragmentos. A distribuição dos fragmentos do SNC de equinos positivos pode ser observada na tabela 3.

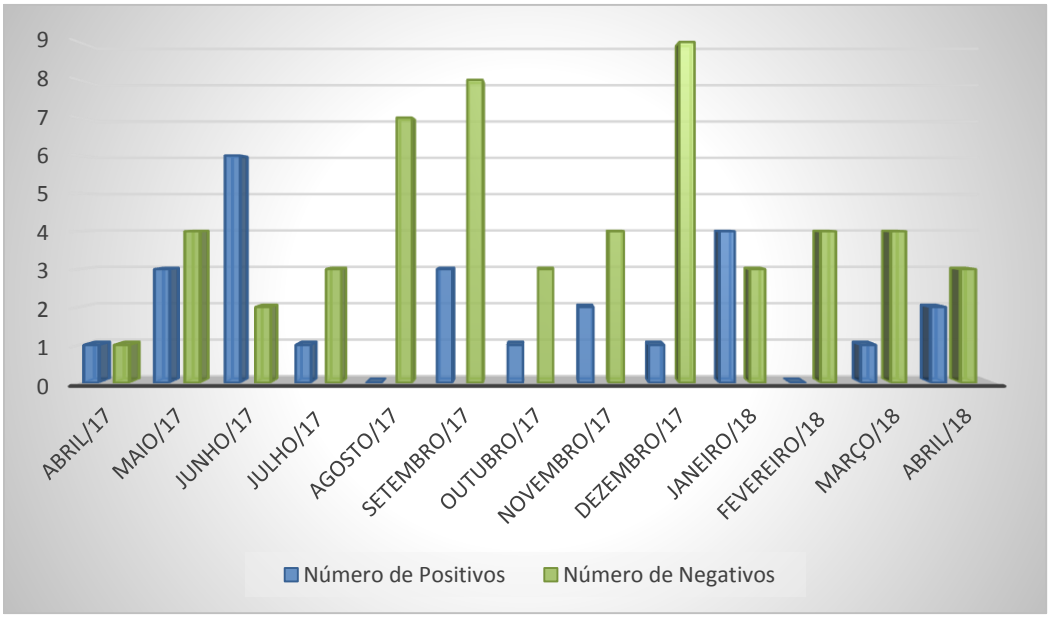
Tabela 3 – Frequência da distribuição dos fragmentos de SNC de equinos positivos para raiva do Estado de São Paulo encaminhados para a Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Pasteur/SP no período de abril de 2017 a abril de 2018

Estruturas	Recebidas/Equinos
Bulbo	18/25(72,0%)
Cerebelo	19/25(76,0%)
Córtex	25/25(100,0%)
Glândulas Salivares *	3/25(12,0%)
Glândulas Parótida	1/25(4,0%)
Glândulas Submandibular	1/25(4,0%)
Hipocampo	25/25(100,0%)
Médula Espinhal *	2/25(8,0%)
Médula Cervical	1/25(4,0%)
Medula Lombar	1/25(4,0%)
Mesencéfalo	24/25(96,0%)
Ponte	21/25(84,0%)
Tálamo	24/25(96,0%)
Tronco encefálico *	1/25(4,0%)

Fonte: Souza, T.C.P. (2019).
Legenda: *****Amostras que não foram identificadas as estruturas

No Gráfico 1, pode ser observada uma maior positividade entre os meses de maio a junho 36% (9⁄25). No entanto, percebeu-se também dois picos de positividade nos meses de setembro de 2017 [12% (3⁄25)] e de janeiro de 2018 [16% (4⁄25)]. Nos restantes dos meses, constatou-se uma média de um animal positivo por mês.

Gráfico 1– Distribuição dos resultados para a raiva das amostras dos equinos recebidas no Instituto Pasteur de Estado de São Paulo durante o período de abril de 2017 a abril de 2018



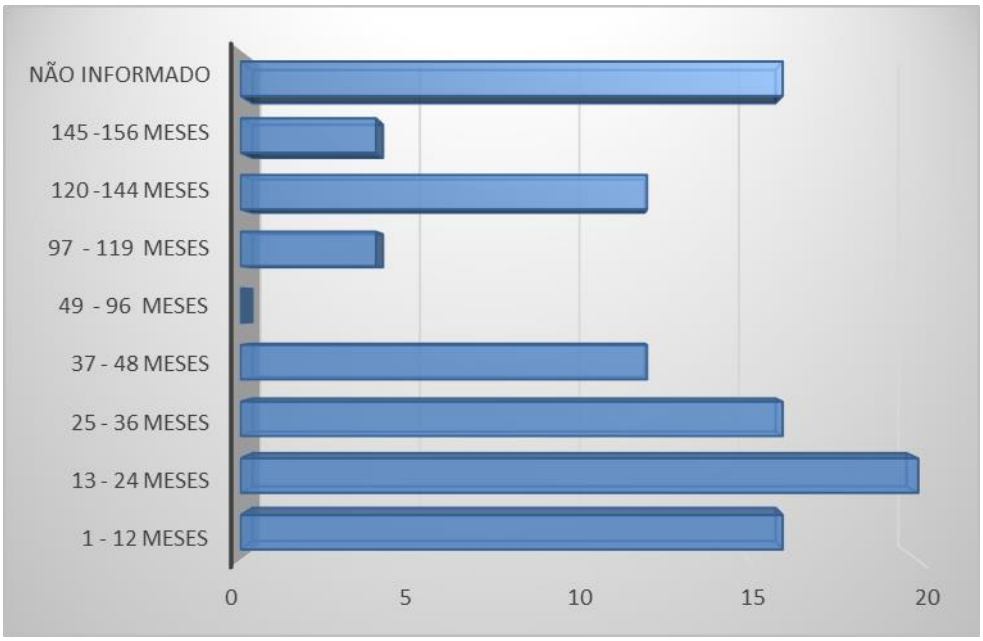
Fonte: Souza, T.C.P.(2019).

Os SNC de equinos positivos para raiva no Instituto Pasteur eram provenientes de animais de várias faixas etárias, sendo o mais jovem com 5 meses e o mais velho com 156 meses com média 50,7 ±50,4 meses, conforme pode ser observada no gráfico 2.

Em relação ao sexo dos equinos, as fêmeas foram mais acometidas 56% (14/25) do que os machos 40% (10/24). Além disso, observou-se que 4% (1/25) dos animais não tinham o gênero informado.

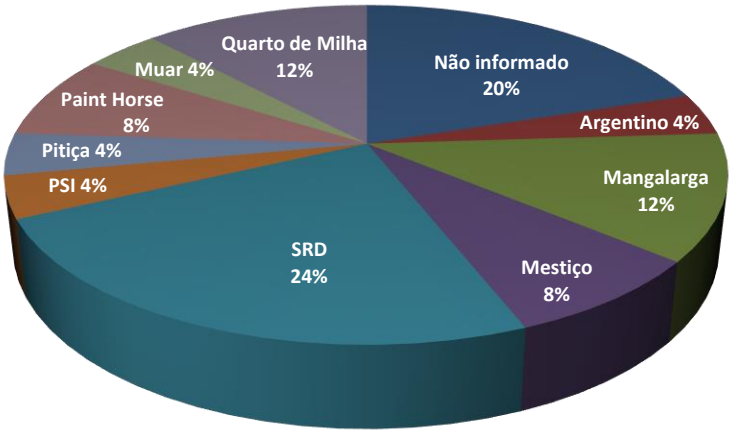
As raças dos 25 cavalos acometidas com RABV estão representadas no gráfico 3, no qual se observa a predominância de animais sem raça definida (24% do total de 25 equinos).

Gráfico 2 – Distribuição quanto à faixa etária dos equinos positivos para raiva do Estado de São Paulo, expressos em porcentagem (%), recebidos no Instituto Pasteur durante o período de abril de 2017 a abril de 2018



Fonte: Souza, T.C.P. (2019).

Gráfico 3 – Perfil racial dos equinos com diagnóstico positivo para raiva do Estado de São Paulo, recebidos no Instituto Pasteur durante o período de abril de 2017 a abril de 2018. Resultados expressos em porcentagem (%)

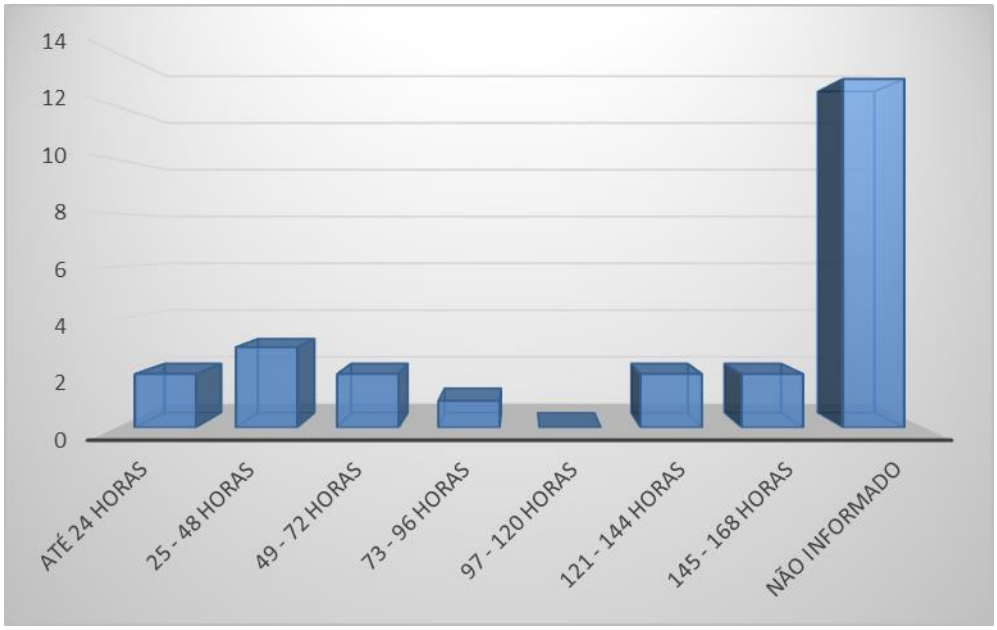


Fonte: Souza, T.C.P. (2019).

Quanto ao curso da doença 12 apresentaram informações nas fichas analisadas. Também foi possível verificar o período médio da evolução da doença foi de 88±54,47 horas (<4 dias), sendo o valor mínimo foi de 24 horas e o máximo de 168 horas (gráfico 4). Dos animais 32% (8/25) apresentaram progresso de até 96 horas sugerindo assim um curso agudo. Já em 6% (4/25) dos animais observou-se um período maior que 121 a 168 horas. No entanto, na maioria dos casos [52% (13⁄25)] não informaram quanto a evolução da doença (Gráfico 4).

Já dos animais que foram eutanasiados, apenas cinco possuíam informações quanto ao tempo decorrido entre a observação da presença de sinais clínicos e a eutanásia, sendo que o período variou de 24 a 168 horas (76,2±57,7 horas) apresentadas respectivamente no quadro 7 e gráfico 4.

Gráfico 4 – Duração do período de evolução da doença nos equinos positivos para a raiva do Estado de São Paulo, expressos em horas, recebidos no Instituto Pasteur durante o período de abril de 2017 a abril de 2018



Fonte: Souza, T.C.P. (2019)

Algumas manifestações clínicas dos 25 equinos positivos para raiva podem estar associadas a lesões do SNC associadas a forma de raiva silenciosa e paralítica. A maioria dos animais apresentaram sintomas relacionados à medula espinhal (17 com incoordenação, 13 com paralisia, mas alerta e 4 com paralisia dos membros) e tronco encefálico (5 com sialorréia). Além disso, outros 14 animais apresentaram movimentos de pedalagem, sinal clínico relacionado com afecção no cérebro (Tabela 4).

Tabela 4 – Sinais clínicos associados aos prováveis locais de lesão no SNC encontrados nos 25 equinos positivos para o RABV do Estado de São Paulo, recebidos no Instituto Pasteur durante o período de abril de 2017 a abril de 2018

Sinais clínicos	
Cerebelo	
Ataxia	1
Opistótomo	1
Cérebro	
Cegueira	1
Convulsões	1
Fotofobia	1
Movimento de Pedalagem	14
Mudanças de atitude	1
Medula Espinhal	
Decúbito	2
Incoordenação	16
Paralisia, mas alerta	13
Paralisia dos membros pélvicos	4
Tronco Encefálico	
Sialorréia	5

Fonte: Souza, T.C.P. (2019).

Dentre as 25 fichas analisadas dos animais positivos, 21 apresentaram informações quanto à vacinação dos animais, sendo que 56 % destes não foram vacinados e apenas 28% foram vacinados contra raiva. Foi possível observar que em 60% (15 animais) dos casos a doença evoluiu naturalmente para óbito, ou seja, ou foi encontrado morto ou morreu durante o período de observação, enquanto que 40% (10 animais) foram eutanasiados. Dois equinos foram vacinados em período menor que um mês e dois animais depois de 6 meses antes da morte e aparecimento dos sinais clínicos (quadro 7).

Foram confirmadas a positividade para o RABV em pelo menos uma das técnicas utilizadas na rotina diagnóstica do Instituto Pasteur (IFD, IVCC, RT-PCR e RT-qPCR), conforme descrito no quadro 7. Destes casos positivos, 96% (24/25) foram confirmados pela técnica de IFD, todas as 25 amostras do SNC foram positivas para RT-PCR e RT-qPCR, com 100% de sensibilidade. Diferentemente, apenas 11 das 25 amostras de SNC apresentaram resultado positivo (44%) pela técnica IVCC.

Os resultados obtidos pela IFD foram confirmados pelas técnicas moleculares. Somente a amostra 3465/17, que apresentou resultado inconclusivo na IFD e negativo no IVCC, foi positivo RT-PCR e RT-qPCR (quadro 7).

A amostra 3465/17 teve o resultado positivo confirmado pela RT-PCR seguida do sequenciamento nucleotídico, confirmando da identidade da linhagem genética como compatível com aquelas isoladas nos morcegos *Desmodus rotundus e/ou Artibeus lituratus*; também conhecidas como compatível com AgV3.

Sete cavalos eutanasiados apresentaram resultados negativos no IVCC. Três animais (2698/17, 3467/17 e 114/18) não apresentaram informação do momento da eutanásia em relação a evolução da doença. Já os outros quatro equinos – (4077/17, 1485/18, 1917/18 e 1918/18) foram eutanasiados no começo da evolução da doença, ou seja, entre 24 a 168 horas do início dos sinais clínicos conforme quadro 7.

Quadro 7 – Resultado das amostras de sistema nervoso central de equinos positivas com relação as técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase tempo real (RT-qPCR), óbito, evolução do óbito em horas e vacinação

Amostra	IFD	IVCC	RT-PCR	RT-qPCR	Óbito	Evolução óbito(horas)	Vacinado
2293/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	Morte Natural	-	-
2465/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Eutanásia	-	N
2467/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Eutanásia	-	N
2698/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	Eutanásia	-	N
3157/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Morte Natural	-	N
3367/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	Morte Natural	-	-
3464/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	Morte Natural	-	N
3465/17	INCONCLUSIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	Eutanásia	-	N
3533/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	Morte Natural	-	N
3651/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Morte Natural	72 horas	N
4077/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	Eutanásia	96 horas	S
5269/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Morte Natural	-	S
5305/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	Morte Natural	72 horas	S
5307/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Morte Natural	168 horas	N
5596/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	Morte Natural	-	N
6243/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	Morte Natural	144 horas	-
6372/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Eutanásia	24 horas	N
6981/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Morte Natural	24 horas	S
114/18	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	Eutanásia	-	N
215/18	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Morte Natural	144 horas	N
518/18	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Morte Natural	-	S
526/18	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	Morte Natural	48 horas	N
1485/18	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	Eutanásia	168 horas	-
1917/18	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	Eutanásia	48 horas	S
1918/18	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	Eutanásia	48 horas	S

Fonte: Souza, T.C.P. (2019).
Legenda: N: Não; S: Sim; -: sem informação.

A sensibilidade e especificidade observados para as técnicas de IFD, RT-PCR e a RT-qPCR foram semelhantes (100%). No entanto, a IVCC apresentou baixa sensibilidade 45,8% (Tabela 5).

Tabela 5 – Sensibilidade (S) e especificidade (E) das técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para diagnóstico da raiva nas amostras de sistema nervoso central de equinos

		IVCC			
		P	**N**	**I**	**Total**
IFD	**P**	11	13	0	24
	N	0	55	0	55
	I	0	1	0	1
	Total	11	69	0	80
S(%)			45,8		
E(%)			100		

		RT-PCR			
		P	**N**	**I**	**Total**
IFD	**P**	24	0	0	24
	N	0	53	2	55
	I	1	0	0	1
	Total	25	53	2	80
S(%)			100		
E(%)			100		

		RT-qPCR			
		P	**N**	**I**	**Total**
IFD	**P**	24	0	0	24
	N	0	40	15	55
	I	1	0	0	1
	Total	25	40	15	80
S(%)			100		
E(%)			100		

Fonte: Souza, T.C.P. (2019).
Legenda: P: Positivo, N: Negativo, I: Inconclusivo

O maior índice de concordância de *Kappa* entre as técnicas foi entre a IFD x RT-PCR teve concordância excelente ($\kappa = 0,9168$), seguida de IFD x RT-qPCR com concordância boa ($\kappa = 0,643$) e com menor índice em relação a IFD x IVCC obteve concordância moderada ($\kappa = 0,5216$) para diagnóstico da raiva nas amostras de SNC de equinos (Tabela 6).

Tabela 6 – Índice de concordância de *Kappa* entre as técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para diagnóstico da raiva nas amostras de SNC de equinos

Testes diagnósticos			Índice de Concordância de Kappa
IFD	X	IVCC	0,5216
IFD	X	RT-PCR	0,9168
IFD	X	RT-qPCR	0,643

Fonte: LANDIS; KOCK, (1977).
Legenda: < que 0,20: de concordância pobre;
0,21 e 0,40: concordância discreta;
0,41 e 0,60: concordância moderada;
0,61 e 0,80: concordância boa ou substancial;
Valores > 0,81: concordância excelente.

Na análise dos resultados a partir dos 161 fragmentos de SNC [encéfalo (cerebelo, tronco encefálico – bulbo, ponte e mesencéfalo -, tálamo, hipocampo, córtex) e medula (cervical e lombar)] provenientes de 25 cavalos positivos, todos os equinos foram positivos para raiva em pelo menos um fragmento nas técnicas moleculares e na IFD sendo que somente a amostra 3465/17 foi classificada como inconclusiva (no córtex, mesencéfalo e tálamo).

Observou-se que as estruturas de SNC que apresentaram maior frequência de positividade pela IFD foram o mesencéfalo [79,16% (19/24)] e hipocampo [76% (19/25)]. Já as porções que tinham menor ocorrência foram o cerebelo [73,68 % (14/19)], ponte [71,42% (15/21)], tálamo [66,7% (16/24)], bulbo [66,7% (12/18)] e córtex [64% (16/25)] (Tabela 7).

Os fragmentos de SNC também foram analisados quanto à intensidade de fluorescência, sendo constatado a maior expressividade no mesencéfalo, sendo que nesta porção de SNC verificou-se em 12 animais (50%) com escore com classes de 3 e 4 na distribuição antigênica. Diferentemente, no hipocampo somente em cinco animais (20%) constatou-se essa maior expressividade na intensidade da fluorescência. Nesta estrutura a intensidade de distribuição antigênica classe 1 foi fraca positiva em sete animais (28%). Cerca de 33% dos fragmentos do SNC (53/161) apresentaram rara presença de antígeno (classificadas como fracas positivas), com apenas uma a três pequenas inclusões em todo o campo microscópico pesquisado (Tabela 7).

Na observação dos resultados positivos pela RT-PCR, os 25 animais apresentaram resultados positivas para raiva em pelo menos uma das estruturas apresentadas. Os fragmentos de SNC que tiveram maior frequência de positividade foram o mesencéfalo (100% - 24/24) e

ponte (100% - 21/21). Já as porções com menor ocorrência foram o tálamo (95,8% - 23/24), bulbo (88,8% - 16/18), cerebelo (84,2% - 16/19), córtex (84% - 21/25) e hipocampo (76%- 19/25) (Tabela 8).

Já na técnica de RT-qPCR, das amostras analisados pelo menos uma estrutura se apresentou positiva para raiva (Tabela 10). Os fragmentos de SNC que tiveram maior frequência de positividade foram o bulbo (88,8% - 16/18), cerebelo (84,2% - 16/19), ponte (80,9% - 17/21) e mesencéfalo (79,1% - 19/24). Nas porções com menor ocorrência foram o córtex (68% - 17/25), hipocampo (64% - 16/25) e tálamo (62,5% - 15/24) conforme Tabela 9.

Na verificação das amostras positivas para RABV, a técnica de IFD apresentou uma positividade em 72% (116/161), negatividade de 22,4%(36/161) e inconclusivos em 5,6 % (9/161) nos fragmentos analisados (Tabela 10).

Na RT-PCR foi observado positividade de 89,4% (144/161) e negatividade de 10,6% (17/161) dos fragmentos analisados por essa técnica. Já na RT-qPCR foram constatados resultados positivos em 75,2% (121/161), negativos em 13% (21/161) e inconclusivos em 11,8 % (19/161) nas diferentes estruturas de SNC analisadas (Tabela 10).

Tabela 7 – Resultados obtidos pela técnica de imunofluorescência direta (IFD) para a distribuição antigênica do RABV

	Bulbo	Cerebelo	Córtex	Hipocampo	Médula Espinhal	Médula Cervical	Medula Lombar	Mesencéfalo	Ponte	Tálamo	Tronco Encefálico
2293/17	-	+	-	-	+	NT	NT	-	-	-	NT
2465/17	++	+++	+++	++++	NT	NT	NT	++++	++	++++	NT
2467/17	NT	NT	+	++	NT	NT	NT	++++	+	+	NT
2698/17	-	Incoclusivo	-	Inconclusivo	NT	NT	NT	+	-	Inconclusivo	NT
3157/17	++	++	+	++	NT	NT	NT	+++	++	++	NT
3367/17	+	-	+	+	NT	NT	NT	+	+	-	NT
3464/17	-	+	-	+	NT	NT	NT	+	-	+	NT
3465/17	NT	NT	Inconclusivo	-	NT	NT	NT	Inconclusivo	NT	Inconclusivo	NT
3533/17	NT	NT	-	++	NT	NT	NT	-	-	-	NT
3651/17	NT	+++	++	++	NT	NT	NT	+++	NT	++	NT
4077/17	NT	NT	+	+	NT	NT	NT	-	+	+	NT
5269/17	++	-	-	-	NT	NT	NT	+	+	+	NT
5305/17	+	++	+	+	NT	NT	NT	++++	+	-	NT
5307/17	+++	+++	+++	+++	++++	NT	NT	++++	++++	+++	NT
5596/17	+	+	+	+	NT	NT	NT	+++	+	++++	NT
6243/17	-	+	+	+	NT	+	+	+	-	-	NT
6372/17	+++	+++	+++	+++	NT	NT	NT	++++	++	+++	NT
6981/17	+	++	+	++	NT	NT	NT	+++	+	+++	NT
114/18	+	+	-	-	NT	NT	NT	-	+	-	NT
215/18	++	+	++	++	NT	NT	NT	+++	+	++	NT
518/18	NT	NT	-	+++	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+
526/18	-	-	+	Incoclusivo	NT	NT	NT	+++	-	++	NT
1485/18	NT	NT	+	+++	NT	NT	NT	+	NT	+	NT
1917/18	Incoclusivo	-	Incoclusivo	+	NT	NT	NT	+	+	++	NT
1918/18	+++	++	++	+	NT	NT	NT	++++	++++	++	NT
Total de Positivos	12	14	16	19	2	1	1	19	15	16	1

Fonte: Souza, T.C.P. (2019).
Legenda: NT: Ausente; -: ausência de inclusões antigênicas; + rara presença de antígenos (1 a 3 inclusões pequenas); ++ presença de campos negativos e escasso número de inclusões; +++ distribuição homogênea de antígenos com campos negativos; ++++ distribuição homogênea de antígenos sem campos negativos;

Tabela 8 – Resultados obtidos pela técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) convencional para o diagnóstico da raiva.

	Bulbo	Cerebelo	Córtex	Hipocampo	Médula Espinhal	Médula Cervical	Medula Lombar	Mesencéfalo	Ponte	Tálamo	Tronco Encefálico
2293/17	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
2465/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
2467/17	NT	NT	POSITIVO	NEGATIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
2698/17	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
3157/17	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
3367/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
3464/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
3465/17	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	NT	POSITIVO	NT
3533/17	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
3651/17	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	NT	POSITIVO	NT
4077/17	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
5269/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
5305/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
5307/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
5596/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
6243/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
6372/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
6981/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
114/18	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NT
215/18	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
518/18	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	NT	NT	NT	POSITIVO
526/18	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
1485/18	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	NT	POSITIVO	NT
1917/18	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
1918/18	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
Total de Positivos	16	16	21	19	1	1	1	24	21	23	1

Fonte: Souza, T.C.P. (2019).
Legenda: NT: Ausente.

Tabela 9 – Resultados obtidos pela técnica transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase tempo real (RT-qPCR) para o diagnóstico da raiva

	Bulbo	Cerebelo	Córtex	Hipocampo	Médula Espinhal	Médula Cervical	Medula Lombar	Mesencéfalo	Ponte	Tálamo	Tronco Encefálico
2293/17	POSITIVO	INCONCLUSIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NT	NT	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NT
2465/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
2467/17	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NT
2698/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
3157/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
3367/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
3464/17	INCONCLUSIVO	INCONCLUSIVO	INCONCLUSIVO	NEGATIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	INCONCLUSIVO	INCONCLUSIVO	NT
3465/17	NT	NT	POSITIVO	INCONCLUSIVO	NT	NT	NT	INCONCLUSIVO	NT	INCONCLUSIVO	NT
3533/17	NT	NT	INCONCLUSIVO	INCONCLUSIVO	NT	NT	NT	INCONCLUSIVO	POSITIVO	INCONCLUSIVO	NT
3651/17	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	NT	POSITIVO	NT
4077/17	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
5269/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NT
5305/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NT
5307/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
5596/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
6243/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	INCONCLUSIVO	POSITIVO	NT
6372/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NT
6981/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NT
114/18	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	NT	NT	NT	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NT
215/18	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	INCONCLUSIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
518/18	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	NT	NT	NT	POSITIVO
526/18	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
1485/18	NT	NT	INCONCLUSIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	NT	POSITIVO	NT
1917/18	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	INCONCLUSIVO	NT
1918/18	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
Total de Positivos	16	16	17	16	2	1	1	19	17	15	1

Fonte: Souza, T.C.P. (2019).
Legenda: NT: Ausente.

Tabela 10 – Resultados obtidos nas técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para diagnóstico da raiva para os fragmentos analisados

	RT-PCR					RT-qPCR							IFD						
	P	**(%)**	**N**	**(%)**	**Total**	**P**	**(%)**	**N**	**(%)**	**I**	**(%)**	**Total**	**P**	**(%)**	**N**	**(%)**	**I**	**(%)**	**Total**
BB	16	88,9	2	11,1	18	16	88,9	1	0,0	1	5,6	18	12	66,7	5	27,8	1	5,6	18
CB	16	84,2	3	15,8	19	16	84,2	1	0,0	2	10,5	19	14	73,7	4	21,1	1	5,3	19
CX	21	84,0	4	16,0	25	17	68,0	5	0,1	3	12,0	25	16	64,0	7	28,0	2	8,0	25
HIP	19	76,0	6	24,0	25	16	64,0	5	20,0	4	16,0	25	19	76,0	4	16,0	2	8,0	25
MD	1	50,0	1	50,0	2	2	100,0	0	0,0	0	0,0	2	2	100,0	0	0,0	0	0,0	2
MD CE	1	100,0	0	0,0	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0	1
MD LB	1	100,0	0	0,0	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0	1
MES	24	100,0	0	0,0	24	19	79,2	2	8,3	3	12,5	24	19	79,2	4	16,7	1	4,2	24
PT	21	100,0	0	0,0	21	17	81,0	2	9,5	2	9,5	21	15	71,4	6	28,6	0	0,0	21
TA	23	100,0	1	4,3	23	15	62,5	5	20,8	4	16,7	24	16	66,7	6	25,0	2	8,3	24
TE	1	100,0	0	0,0	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0	1
TOTAL	144	89,4	17	10,6	161	121	75,2	21	13,0	19	11,8	161	116	72,0	36	22,4	9	5,6	161

Fonte: Souza, T.C.P. (2019).
Legenda: P: Positivo; N: Negativo; I: Inconclusivo.
BB: bulbo; CB: cerebelo; CX: córtex; HIP: hipocampo; MD: medula espinhal; MD CE: medula cervical; MD LB: medula lombar; MES: mesencéfalo; PT: ponte; TA: tálamo; TE: tronco encefálico.

Foram avaliadas 5 glândulas de equinos positivos para o RABV pela técnica de RT-PCR, sendo que todas as amostras apresentaram resultados negativos para o diagnóstico da raiva (Quadro 8). Foi também realizada a técnica de RT qPCR para as mesmas, onde apenas uma amostra (5305/17) apresentou resultado positivo na glândula salivar, somente quando se extraiu o RNA pelo método de esferas (*beads*) magnéticas.

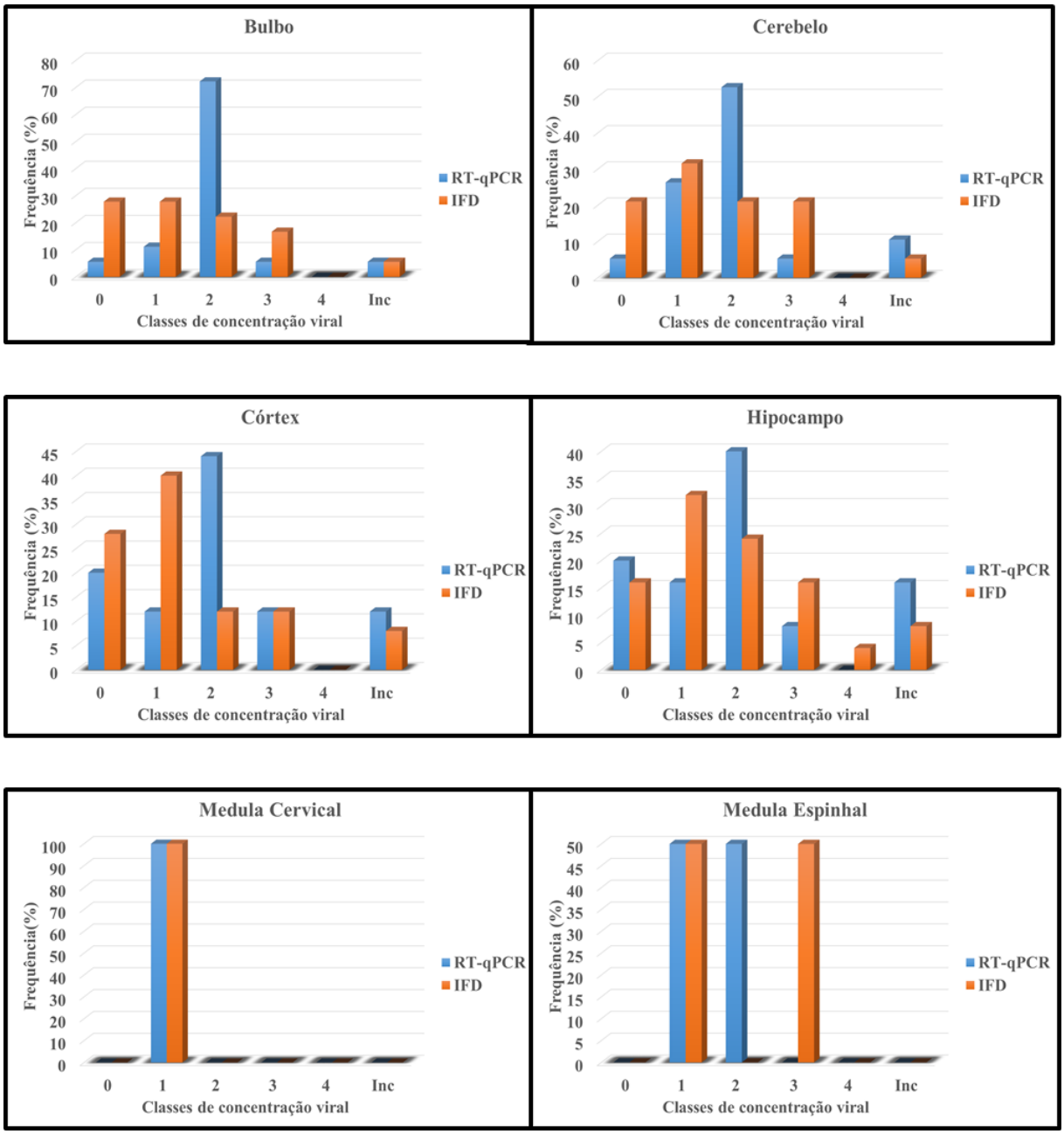
Quadro 8 – Amostras das glândulas de equinos positivos para o RABV de acordo com os resultados obtidos pela técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) convencional para o diagnóstico da raiva

	Glândula Salivar		**Glândula Submandibular**		**Glândula Parótida**	
	RT-PCR	**RT-qPCR**	**RT-PCR**	**RT-qPCR**	**RT-PCR**	**RT-qPCR**
2293/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NT	NT	NT	NT
5305/17	NEGATIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	NT
5596/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NT	NT	NT	NT
6243/17	NT	NT	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Fonte: Souza, T.C.P. (2019).
Legenda: NT: Ausente

De acordo com os escores nas técnicas de IFD e RT-qPCR cerebelo, tronco encefálico (bulbo, ponte e mesencéfalo), tálamo, hipocampo, córtex, medula cervical e medula lombar. Foi possível observar que de modo geral houve pouca concordância entre os resultados das duas técnicas(figura4).

Figura 4 – Frequência em porcentagem (%) das classes de concentração antigênica e viral dos fragmentos do sistema nervoso central de equinos positivos para a raiva, pelas técnicas de imunofluorescência direta (IFD), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase tempo real (RT-qPCR para diagnóstico da raiva para os fragmentos analisados

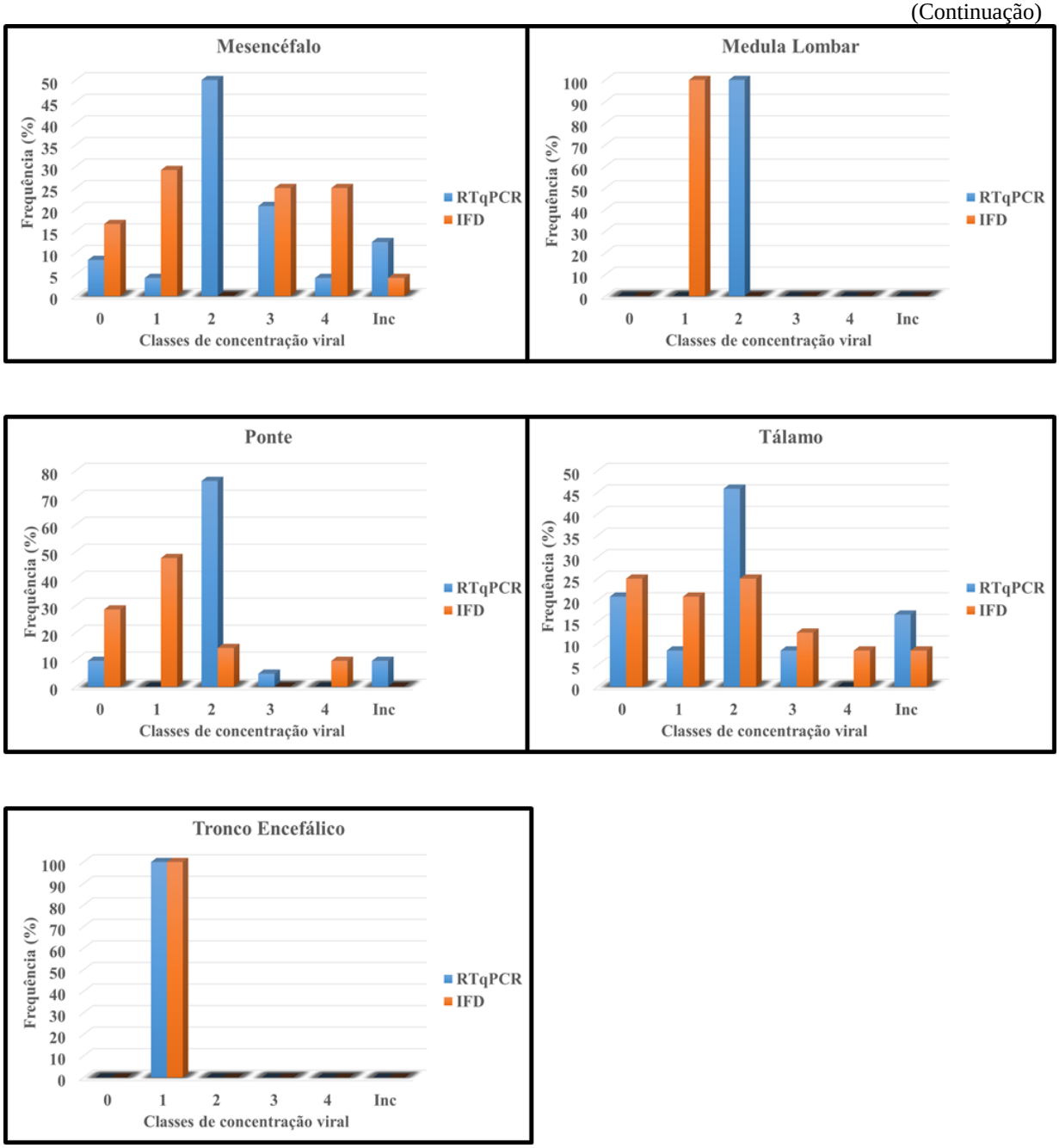


Fonte: Souza, T.C.P.(2019).

(Continua)

Figura 4 - Frequência em porcentagem (%) das classes de concentração antigênica e viral dos fragmentos do sistema nervoso central de equinos positivos para a raiva, pelas técnicas de imunofluorescência direta (IFD), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase tempo real (RT-qPCR para diagnóstico da raiva para os fragmentos analisados

(Continuação)



Fonte: Souza, T.C.P. (2019).

(Conclusão)

5 DISCUSSÃO

Das 80 amostras de equinos analisadas, 25 apresentaram diagnóstico positivo para o vírus da raiva; demonstrando uma positividade de 31,25%. Todas as amostras eram dos municípios do estado de São Paulo, a doença foi causada principalmente pelo vírus da raiva isolado do morcego hematófago *Desmodus rotundus*.

De modo semelhante, Costa et al. (2009) em levantamento realizado no período de outubro de 2004 a fevereiro de 2006, em 112 amostras SNC de equinos provenientes de Minas Gerais 37 foram positivos para raiva (33%). Números menores foram observados em trabalho realizado pelo mesmo grupo de pesquisa (COSTA et al., 2015), em 170 amostras coletadas no Estado de Minas Gerais no período de janeiro de 2009 a janeiro 2011, das quais foram positivas para raiva apenas 47 (21,7%).

Em pesquisa realizada no período de 2007 a 2012 realizado no Instituto Biológico, por Cunha et. al., 2016 com amostras de SNC de cavalos oriundos do estado de São Paulo e outros estados brasileiros do total de 218 equinos analisados, foi observado que 37 equinos (17%) foram positivos para raiva. Já no trabalho realizado durante o período de 1981 a 1994, por Peixoto et al. (2000) foi observado 15,7% (111/703) de positividade em amostras de equinos provenientes da Seção de Raiva e Encefalomielite do Instituto Biológico.

No presente trabalho a maioria dos animais positivos (38,1%) estão localizados na região de São João da Boa Vista que engloba os municípios de Espírito Santo do Pinhal e Itapira. Sabe-se que esta região é fronteiriça do estado de São Paulo com Minas Gerais (76% dos casos), que foi classificada como epidêmica para raiva em herbívoros pela Comissão Estadual do Programa de Raiva no ano de 2000 (KOTAIT et al 2010). Também foram observados número expressivos de casos nas regiões de Campinas, Taubaté e Piracicaba, sendo que os dois primeiros foram considerados como epidêmicas e a última como endêmica pela Comissão Estadual do Programa de Raiva em herbívoros.

Esta divisão do estado São Paulo em áreas de risco epidemiológico da raiva dos herbívoros, foi importante na época para a Defesa Agropecuária estabelecer as medidas de controle e profilaxia da raiva dos herbívoros. Naquele momento estabeleceu-se a obrigatoriedade de vacinações nas regiões denominadas epidêmicas e endêmicas a partir de setembro de 2001 na Resolução 29 (SAA, 2001).

De modo similar, no trabalho realizado por Centoamore (2017), a maioria dos casos positivos foram da região fronteiriça entre os estados de São Paulo e Minas Gerais (77% dos casos). Em outro trabalho realizado por Carrieri et al. (2006), observou-se que 53,4% de todos

os animais testados para raiva pelas técnicas de IFD e IVC em amostras do Instituto Pasteur no período de outubro de 2000 a maio de 2003 foram provenientes de 14 cidades da região leste do estado de São Paulo. Provavelmente, a menor positividade observada no presente experimento se explica pela procedência das amostras de todas as regiões do estado de São Paulo, diferente do apresentado por Carrieri et al. (2006), nas quais selecionou-se apenas amostras originárias de uma região considerada epidêmica para raiva em herbívoros.

O maior número de positivos (36% dos casos) ocorreu no período de maio a junho durante as estações de outono e inverno. Mas também foram observados, ocorrência de positivos na primavera e verão, indicando uma tendência a não ter distribuição sazonal de modo semelhante ao descrito por diversos autores. Portanto são dados imprecisos sujeitos a não uniformidade de coletas de informações (GREEN et al., 1992; GREEN, 1993; IRVIN, 1970).

Foi observado maior ocorrência em animais jovens com média (50,7 ± 50,4 meses). Números semelhantes foram observados por Green et al. (1992), cuja a média de idade observada foi de 5 anos (60 meses). Diferente de Green et al. (1993), 43% dos cavalos tinham menos de 1 ano de idade, no presente estudo apenas 16% estavam nessa faixa etária.

Striegel e Gretzhg (1983) no período de 1978 a 1983, não observaram diferenças na faixa etária que variaram de 10 meses a 21 anos no estudo realizado em *Iowa State University*, no qual foram diagnosticados somente 12 equinos com raiva. Já Centoamore (2017) observou que os animais mais jovens eram os mais acometidos, isto pode estar relacionado ao fato de que o animal mais jovem tem maior risco de exposição, devido à sua intensa curiosidade e à sua menor capacidade de se defender das agressões dos animais selvagens (GREEN et al., 1992).

Em relação ao gênero, as fêmeas foram as mais acometidas (56%), no entanto vários autores (STRIEGEL; GRETZHG, 1983; GREEN et al., 1992) não observaram diferença de ocorrência de raiva entre os sexos.

A maior parte dos animais acometidos eram sem raça definida (SRD – 24%) ou mestiço (8%). Entretanto, essa informação apresenta viés, pois 20% das fichas não continham informação sobre a raça do cavalo. Green et al. (1992) não observou predileção racial, mas no presente trabalho foi informada a ocorrência de positividade em algumas raças, a saber Mangalarga (12%), Quarto de milha (8%), PSI (4%), Argentino (4%), e Pitiça (4%). De modo semelhante, trabalhos realizados por Striegel e Gretzhg (1983) observaram casos de raiva em cinco raças diferentes.

Quanto à evolução da doença, 13 fichas (52%) não continham informações clínicas do animal. As notificações contidas no histórico do animal dependem da observação do

proprietário, do tratador do animal, ou mesmo do profissional responsável pelo atendimento do caso.

O período médio de evolução da doença foi de 88±54,47 horas (<4 dias), sugerindo assim um curso agudo de modo semelhante ao que Striegel e Gretzhg (1983) relataram: evolução clínica de 3 a 7 dias até o óbito. Green et al. (1992) observaram um período médio de sobrevivência de 4,3 dias (variando de 1 a 7 dias) daqueles que morreram naturalmente. Essa evolução aguda deve-se à maior susceptibilidade da espécie à infecção pelo RABV.

A maioria das manifestações clínicas observadas está relacionada a forma de raiva paralítica. Em 20% dos animais, observou-se a presença de sialorréia. Do mesmo modo, Hudson et al, (1996) observaram a salivação em poucos animais. Dois dos sintomas mais predominantemente observados foram incoordenação (68%) e paralisia (52%), sendo características da forma paralítica da enfermidade. Esses achados corroboram com aqueles descritos por vários autores (CARINI, 1911; STRIEGEL; GRETZHG, 1983; GREEN, 1993; GREEN et al., 1997).

Diferente do mencionado na literatura por Green (1993), os movimentos de pedalagem foram uma manifestação comum (56% dos casos), indicando também presença de raiva furiosa concomitante com a forma paralítica. Pelas manifestações apresentadas, foram acometidas diversas regiões do SNC, muitas vezes de modo simultâneo, indicando assim a importância do envio de todas as estruturas para se ter um diagnóstico mais acurado.

Em apenas um animal 3465/17 não foi confirmada a positividade pela técnica de IFD (Quadro 7). Pelos resultados apresentados, reforça-se o conceito da situação na qual se tem baixa carga viral no SNC de equinos (CARRIERI et al., 2006), na qual a ausência de estruturas do tronco encefálico e medula poderiam comprometer o resultado da IFD. Para complicar esse cenário no diagnóstico da raiva em equinos, o animal 3465/17 não apresentava estruturas como bulbo, cerebelo e ponte. Além disso, nesse caso, apresentou resultados inconclusivos em fragmentos como córtex, mesencéfalo e tálamo e ausência de antígenos detectáveis no hipocampo.

Esse cenário de ausência de certas estruturas importantes no diagnóstico da raiva em herbívoros corrobora com as recomendações do CDC de Atlanta/EUA, que mesmo em situações com resultados negativos na IFD, deve-se laudar na inexistência do tronco encefálico como resultado inconclusivo, até sair o diagnóstico definitivo com a prova confirmatória. Padrões de distribuição do RABV no SNC sugerem a necessidade do exame completo da secção

transversal do tronco encefálico, devido a possibilidade de disseminação unilateral em caso de baixa carga viral (WHO, 2018).

Salienta-se que o animal 3465/17 diagnosticado como inconclusivo na IFD foi submetido a eutanásia. Sabe-se que o tronco encefálico é a primeira estrutura do encéfalo a ser infectada. Portanto nos estágios iniciais da doença são particularmente necessários a coleta e o envio dessa estrutura para diagnóstico. Em repetidas ocasiões, pode-se ocorrer positividade somente nessa porção, sendo que outras estruturas como hipocampo, cerebelo e córtex cerebral podem ser negativas (DEAN et al., 1996).

Menos da metade das amostras de equinos positivas confirmaram o resultado no IVCC (Quadro 7). A maioria das amostras apresentou resultados discordantes (10/13) na IVCC, sendo negativos nesta técnica e positivos nas demais, apresentaram baixa carga viral na IFD (Tabela 7). Ressalta-se também que destas amostras com resultados discordantes, sete animais foram submetidos a eutanásia e três animais vieram a óbito com evolução aguda em 6 dias (<144 horas do início dos sintomas) (Quadro 7).

Faz-se o IVCC no Instituto Pasteur a partir do "*pool*" das diferentes estruturas do SNC, fato este que pode ser considerado um viés metodológico, visto que está comprovado por diversos trabalhos que a distribuição da raiva não é homogênea no SNC (SILVA et al., 1974; CARRIERI et al., 2006; SILVA et al., 2010). Nas situações de baixa carga viral, poderia ocorrer "diluição" dessas estruturas ao acrescentar outras negativas (sem vírus).

De modo diferente dos resultados observados na IFD, a sensibilidade diagnóstica observada ao IVCC foi de apenas 45,8%. Este resultado ficou bastante aquém do esperado, pois havia a expectativa de uma maior sensibilidade com alta concordância dos resultados com a IFD. BOURHY et al. (1989), observaram alta concordância (99,75%) entre as técnicas de IVCC e IFD com sensibilidade diagnóstica próxima de 100%. Meslin; Kaplan, (1996) e Castilho et al., (2007) mencionam que a técnica de IVCC tem sensibilidade equivalente à da IFD. Por sua vez, no presente trabalho a concordância entre essas duas técnicas (IFD e IVCC) foi considerada moderada com índice de *Kappa* = 0,5216.

No entanto em situações de baixa carga viral, como as observadas no presente experimento, sua utilidade como prova confirmatória fica questionada devido ao seu baixo desempenho. Além disso, apesar de não ser avaliado no presente trabalho, as amostras de SNC de animais de produção no Brasil, devido as condições precárias de acondicionamento e armazenamento, podem chegar no laboratório para diagnostico em estado de deterioração (autólise). Nessas

condições, ocorre o aumento de citotoxicidade nas amostras clínicas, fato que pode contribuir na diminuição da sensibilidade da técnica de IVCC (WHO, 2018).

As técnicas moleculares (RT-PCR e RT-qPCR) apresentaram sensibilidade diagnóstica equivalente a 100%, em relação à IFD. Resultados semelhantes foram observados por WADHWA et al. (2017) e GIGANTE et al (2018) utilizando a técnica de RT-qPCR.

A técnica de IFD requer amostras em condições adequadas de conservação/refrigeração (WHO, 2018). Nas situações de material em autólise a detecção de ácido nucleico nas provas moleculares mostrou-se possível mesmo em condições extremas de conservação (MCELHINNEY, et al., 2014). Além disso, como a distribuição de RABV não é uniforme no SNC, o uso das estruturas localizadas no tronco encefálico e cerebelo devem ser priorizados nos testes moleculares nas situações nas quais tem-se uma quantidade limitada de amostra. A única amostra positiva (3465/17) que apresentou resultado inconclusivo na IFD teve a sua positividade confirmada pelo sequenciamento nucleotídico, com variante compatível com aquelas isoladas em morcegos *Desmodus rotundus.*

Em relação a positividade na técnica de IFD, as estruturas do SNC que apresentaram maior frequência foram o mesencéfalo e o hipocampo. No entanto, ao avaliar-se a intensidade de fluorescência foi o mesencéfalo a estrutura do SNC com maior expressividade, indicando ser uma porção mais fácil de identificar o antígeno do RABV do que o hipocampo. Verificou-se também que cerca de 35% de todas as estruturas analisadas foram classificadas como fracas positivas em relação a intensidade, sendo assim de difícil diagnóstico. Resultados esses que corroboram com aqueles encontrados por outros autores que mencionaram o tronco encefálico e a medula espinhal como as estruturas de eleição para o diagnóstico da raiva em equinos (CARRIERI et al., 2006; BASSUINO et al., 2016). Somente em dois animais foram enviados a medula espinhal, e devido a pequena amostragem, não se constatou vantagem diagnóstica do exame desta estrutura.

Com relação a frequência de positividade pela técnica da RT-PCR, a estrutura que teve maior detecção do RNA viral foi o mesencéfalo, de modo semelhante ao observado pela IFD. No entanto essa estrutura estava ausente em quatro animais.

De modo geral pelos resultados obtidos, pode-se afirmar que a RT-PCR teve maior detecção de positivos (89,4% - 144/161) em relação a IFD (72% - 116/161), indicando maior sensibilidade por esse teste molecular. Apesar disso, em algumas situações ocorreram resultados divergentes, nos quais eram negativos na RT-PCR e positivos na IFD com classe 1 e 2 (uma e duas cruzes) de intensidade antigênica. Nessas condições, provavelmente a não

detecção pela RT-PCR sugere problemas na amplificação dos ácidos nucleicos nas amostras extraídas com TRizol. Essa técnica do RNA com o reagente TRizol é um processo demorado e laborioso de execução, que requer várias etapas de lavagem e centrifugação que pode levar a perda da amostra, resultando assim em um baixo rendimento. Os *pellets* de RNA são difíceis de ressuspender após a purificação. Além disso, essa técnica aumenta o risco de degradação, variações e erros (ELDH et al., 2012).

A RT-qPCR (75,2% - 121/161) teve menor desempenho na detecção de positivos em relação a RT-PCR (89,4% -144/161). No entanto, essa baixa eficiência de amplificação pela técnica de RT-qPCR gerando resultados inconclusivos, provavelmente decorrentes dos problemas da extração de RNA por TRizol. Resultados semelhantes foram observados por Centoamore (2017) em amostras positivas para raiva de bovinos extraídas com TRizol.

Chierato et al. (2018), em estudo comparativo de duas técnicas de extração de RNA, constataram maior detecção de ácido nucleico do RABV nas amostras extraídas pelo método com colunas de membrana de silíca em relação com aquelas extraídas com TRizol.

Devido ao pequeno universo amostral dos animais positivo (n=5) com presença de glândulas salivares, os resultados obtidos no presente experimento não permitem fazer uma inferência definitiva sobre a eliminação viral nessa estrutura anatômica. Apenas em um cavalo (5305/17) foi possível a detecção pela técnica RT-qPCR, animal que apresentava classe 4 de intensidade antigênica no mesencéfalo. Os resultados sugerem eliminação viral na saliva em hospedeiros terminais como equinos em situações com alta carga viral, sugerindo potencial risco para seres humanos expostos a animais infectados pela raiva (CARRIERI et al., 2006).

As dificuldades entre os padrões de limiar da detecção entre as técnicas de IFD e RT-PCR, primeiramente podem ser explicados pelas diferenças metodológicas, uma vez que os métodos moleculares identificam a presença de ácido nucleico viral, enquanto que a IFD se baseia na detecção antigênica. Como a transcrição e replicação virais são processos naturais e dinâmicos, a variação observada entre a intensidade da marcação antigênica e a concentração viral do RABV poderiam estar relacionados com: 1) grau de propagação e degradação do mRNA (RNA mensageiro) do vírus não ocorrendo no mesmo aspecto com os antígenos virais e/ou 2) Condições características ao hospedeiro quanto ao controle da transcrição genômica no RABV (SHUANGSHOTI et al., 2013).

Em decorrência do elevado número de resultados inconclusivos obtidos pela técnica RT-qPCR *SYBR Green*, maiores estudos são necessários com o intuito de refinar os procedimentos,

desde a implantação de técnicas de extração alternativas ao TRizol até pesquisas comparativas de sensibilidade e especificidade analítica com os testes de RT-qPCR.

6 CONCLUSÃO

6.1 O RABV não distribui de maneira uniforme no SNC de equinos naturalmente infectados. Em vista disto salienta-se a importância do médico veterinário coletar todas as estruturas de SNC, principalmente aquelas pertencentes ao tronco encefálico.

6.1.1 A partir dos resultados obtidos ao avaliar a intensidade da fluorescência e frequência de positividade pela técnica de IFD em amostras de equinos positivas para raiva, pode-se concluir que a estrutura de SNC de escolha seria o mesencéfalo. Na inexistência dos fragmentos do tronco encefálico, o laudo deve ser considerado inconclusivo, mesmo na ausência de antígenos detectáveis.

6.1.2 Apoiado nos resultados alcançados pela RT-PCR (seguido de sequenciamento nucleotídico), devido a sua maior eficiência na detecção de positivos nas diferentes estruturas de SNC em relação as outras provas laboratoriais realizadas no presente estudo, recomenda-se esta prova molecular como confirmatória de preferência no diagnóstico da raiva.

6.2 Com a detecção do RABV nas glândulas salivares pode-se inferir que a eliminação viral pela saliva confirma a possibilidade da espécie de equinos atuar como provável fonte de infecção para a espécie humana.

6.3 Ao comparar a sensibilidade diagnóstica, pode-se afirmar que as técnicas moleculares (RT-PCR e RT-qPCR) apresentaram maior desempenho de 100% e devem ser utilizadas como teste confirmatório nos resultados inconclusivos da IFD.

6.4 O IVCC em amostras de equinos apresentou baixo desempenho e maiores estudos devem ser realizados nesta espécie para validar a pesquisa desta técnica diagnóstica.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; MÁLAGA-ALBA, M. Economic losses due to *Desmodus rotundus*. In: GREENHALL, A.M.; SCHMIDT, U. (Ed.). **Natural history of vampire bats**. Flórida: CRC Press, 1988. p. 207-214.

ACHKAR, S. M.; FERNANDES, E. R.; CARRIERI, M. L.; CASTRO, A. B. M.; BATISTA, A. M.; DUARTE, M. I. S.; KOTAIT, I. Sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica em fragmentos de sistema nervoso central de bovinos e equinos naturalmente infectados pelo vírus da raiva. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 211-218, mar 2010.

ARAÚJO, F. A. A. **Raiva humana no Brasil, 1992-2001**. 2002. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária (UFMG), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

BASSUINO, D. M; KONRADT, G.; CRUZ, R. A. S.; SILVA, G. S.; GOMES, D. C.; PAVARINI, S. P.; DRIEMEIER, D. Characterization of spinal cord lesions in cattle and horses with rabies: the importance of correct sampling. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 4, p. 455-460, 2016.

BOURHY, H.; ROLLIN, P.E.; VINCENT, J.; SUREAU, P. Comparative field valuation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. **Journal Clinic Microbiology,** v. 27, n. 3, p. 519-523, March,1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Profilaxia da Raiva. **Casos de raiva humana notificados e percentual de casos transmitidos segundo a espécie animal.** Brasília, DF, Brasil: MS, 2005.

BRASIL. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva**. Ministério da Saúde, Brasília, 2008. 23 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva dos herbívoros.** Brasília, DF, Brasil: MAPA, 2009. 124 p.

BREDT, A. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde, 1996. 117 p.

CALDAS, E. P.; WADA, M. Y. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Brasil. Protocolo para tratamento de raiva humana no Brasil. **Epidemiologia Serviço Saúde,** Brasília, v. 18, n. 4, p. 385-394, out-dez 2009.

CARINI, A. Sur une grande épizootie de rage. **Ann Instituto Pasteur**, v. 25, p. 843-846, 1911.

CARNEIRO, V. As epizootias de raiva na América e o papel dos morcegos hematófagos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 7, p. 273-321, 1936.

CARRIERI, M. L.; PEIXOTO, Z. M. P.; PACIÊNCIA, M. L. B.; KOTAIT, I.; GERMANO, P. M. L. Laboratory diagnosis of equine rabies and its implications for human postexposure

prophylaxis. **Journal of Virology Methods,** v. 138, p. 1–9, Jul. 2006.

CASTILHO, J. G.; IAMAMOTO, K.; LIMA, J. Y. O.; SCHEFFER, K. C.; CARNIELIE JR., P.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; ACHKAR, S. M.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A). **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 47, p. 12-18, 2007.

CENTOAMORE, N. H. F. **Estudo da neuroinvasividade do vírus da raiva em amostras de sistema nervoso central de bovinos**. 2017. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

CHIERATO, M. E. R.; CENTOAMORE, N. H. F.; SOUZA, T. C. P.; MESQUITA, L. P.; MAIORKA, P. C.; ASANO, K. M.; SCHEFFER, K. C.; FAHL, W. O.; IAMAMOTO, K.; MORI, E. Comparative Performance Study Of Two RNA Extraction Methods By Thr RT-PCR And RT-qPCR Techniques From Bovines Central Nerve System (CNS) Samples Naturally Infected By Rabies Virus (Rabv). In: Rita (Reunião Internacional de Raiva das Americas). 29., 2018, Buenos Aires. **Resumos...,** Buenos Aires, Argentina, 2018. p. 145.

COERTSE, J.; WEYER, J.; NEL, L. H.; & MARKOTTER, W. Improved PCR methods for detection of African rabies and rabies-related lyssaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 3949-3955, 2010.

Coordenadoria de Defesa Agropecuária De São Paulo - CDA/SP. Casos de raiva em equino no Estado de São Paulo. Disponível em: < https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/programas/?/sanidade-animal/programa-estadual-de-controle-da-raiva-dos-herbivoros>. Acesso em: 07 fev 2019.

COSTA, E. A.; VASCONCELOS, A. C.; BOMFIM, M. R. Q.; SILVA, M. X.; HADDAD, J. P. A.; AMORIM, H. B.; RESENDE, M. Epidemiological and clinical aspects of equine Herpesvirus encephalitis infection in horses that died with neurological signs from Minas Gerais state, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 4, p. 262-272, 2009.

COSTA, E. A.; ROSA, R.; OLIVEIRA, T. S.; FURTINI, R.; JÚNIOR, A. F.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Etiologic diagnosis of diseases of the central nervous system of horses in Minas Gerais State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 2, p. 391-399, 2015.

CUNHA, E. M. S.; DE SOUZA, M. D. C. C.; LARA, H.; CASSAROVILLALOBOS, E. M.; DE CASTRO N. A. F.; DEL FAVA, C.; SCANNAPIECO, E. M.; CUNHA, M.S.; MORI, E. Causes of encephalitis and encephalopathy in Brazilian equids. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 38, p. 8-13, 2016.

DACHEUX, L.; WACHARAPLUESADEE, S.; HEMACHUDHA, T.; MESLIN, F. X.; BUCHY, P.; REYNES, J. M.; BOURHY, H. More accurate insight into the incidence of human rabies in developing countries through validated laboratory techniques. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 11, p. e765, 2010. Doi: doi.org/10.1371/journal.pntd.0000765.

DACHEUX, L.; DELMAS, O.; BOURHY, H. Human rabies encephalitis prevention and

treatment: progress since Pasteur's discovery. **Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)**, v. 11, n. 3, p. 251-299, Janeiro, 2011.

DAVID, D.; YAKOBSON, B.; ROTEMBERG, D.; DVERES, N.; DAVIDSON, I.; STRAM, Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. **Veterinary Microbiology,** v.87, p.111-118, 2002.

DE OLIVEIRA, P. R.; SILVA, D. A. R.; ROCHA, J. H.; DE MELO, S. M. A.; BOMBONATO, N. G.; CARNEIRO E SILVA, F. O. Levantamento, cadastramento e estimativa populacional das habitações de morcegos hematófagos, antes e após atividades de controle, no município de Araguari, Mg. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 76, n. 4, p. 553–560, 2009.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody tes. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Laboratory techiniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 88–95.

Departamento de Saúde Animal –DSA/DAS Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/raiva-dos-herbivoros-e-eeb/DADOSRAIVAATE2015.pdf/view>. Acesso em: 07 fev 2019

ELDH, M.; LÖTVALL, J.; MALMHÄLL, C.; & EKSTRÖM, K. Maria et al. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: evaluation of different methods. **Molecular Immunology**, v. 50, n. 4, p. 278-286, 2012.

FAVORETTO, S. R.; CARRIERI, M. L.; CUNHA, E. M. S.; AGUIAR, E. A. C.; SILVA, L. H. Q.; SODRÉ, M. M.; SOUZA, M. C. A. M.; KOTAIT, I. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 2, p. 91–95, 2002.

FAVORETTO, S. R.; DE MATTOS, C. C.; DE MORAIS, N. B.; CARRIERI, M. L.; ROLIM, B. N.; SILVA, L. M.; RUPPRECHT, C. E.; DURIGON, E. L.; DE MATTOS, C. A. Rabies virus maintained by dogs in humans and terrestrial wildlife, Ceará State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1978–1981, 2006.

FAVORETTO, S. R.; DE MATTOS, C. C.; MORAIS, N. B.; ALVES ARAÚJO, F. A.; DE MATTOS, C. A. Rabies in marmosets (Callithrix jacchus), Ceará, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1062–1065, 2001.

FEKADU, M. Rabies in Ethiopia. **American Journal of Epidemiology**, v. 115, n. 2, p. 266-273, 1982.

FISCHER, M.; FREULING, C. M.; MÜLLER, T.; WEGELT, A.; KOOI, E. A.; RASMUSSEN, T. B.; VOLLERE, K.; MARSTONE, D.A.; FOOKS, A. R.; BEER, M.; HOFFMANN, B. Molecular double-check strategy for the identification and characterization of European Lyssaviruses. **Journal of virological methods**, v. 203, p. 23-32, 2014.

FLORES-CRESPO, R.; LINHART, S. B.; BURNS, R. J.; MITCHELL, G. C. Foraging behavior of the common vampire bats related to moonlight. ***Journal Mammalogy***, n. 53, p. 366-368, 1972.

FOOKS, A. R.; JOHNSON, N; FREULING, C. M.; WAKELEY, P. R.; BANYARD, A. C.; MCELHINNEY, L. M.; MARSTON, D. A.; DASTJERDI, A.; WRIGHT, E.; WEISS, A. R.; MULLER, T. Emerging technologies for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21st century. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 9, p. e530, 2009. Doi: doi.org/10.1371/journal.pntd.0000530.

FOOKS, A. R.; BANYARD, A. C.; HORTON, D. L.; JOHNSON, N.; MCELHINNEY, L. M;, JACKSON, A. C. Current status of rabies and prospects for elimination. **The Lancet**, Surrey KT15 3NB UK, v. 384, n. 9951, p. 1389-1399, May, 2014. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62707-5.

GIGANTE, C. M.; DETTINGER, L.; POWELL, J. W.; SEIDERS, M.; CONDORI, R. E. C.; GRIESSER, R.; KENNETH, O.; CARLOS, M.; PESKO, K.; BRECKENRIDGE, M.; SIMON, E. M. M.; CHU, M. Y. J. V.;DAVIS, A. D.; BRUNT, S. J.; ORCIARI, L.; YAGER, P.; CARSON, W. C.; HARTLOGE, C.; SALIKI, J. T.; SANCHEZ, S.; DELDARI, M.; HSIEH, K.; WADHWA, A.; WILKINS, K.; PEREDO, V. Y.; RABIDEAU, P.; GRUHN, N.; ROLAIN CADET, R.; ISLOOR, S.; NATH, S.S.; JOSEPH, T.; GAO, J.; WALLACE, R.; REYNOLDS, M.; OLSON, V. A.; LI Y.; Multi-site evaluation of the LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR assay for postmortem rabies diagnostics. **PloS one**, v. 13, n. 5, p. e0197074, 2018. Doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0197074.

GONÇALVES, M. **Estudo da relação causal do surto de raiva em 1991/1992, provocados por morcegos em três municípios (Conde, Aporá e Ipirá) do Estado da Bahia.** 1996. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Departamento de Zoologia. Universidade Federal da Bahia, Ondina, 1996.

GONÇALVES, M. A. S; SÁ-NETO, R. J.; BRAZIL, T. K. Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 453-460, 2002.

GREEN, S. L.; SMITH, L. L.; VERNAU, W.; BEACOCK, S. M. Rabies in horses: 21 cases (1970-1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association,** v. 200, n. 8, p. 1133-1137, April, 1992.

GREEN, S. L. Equine Rabies. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v.9, n. 2, p.337-347, August, 1993.

GREEN, S. L. Rabies. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 13, n. 1, p. 1-11, April, 1997.

CVE - CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Grupos de Vigilância Epidemiológica**. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/institucional/gve/gvemum.htm/>. Acesso em: 07 fev. 2019.

HANLON, C. A.; NADIN-DAVIS, S. A. Laboratory diagnosis of rabies: Laboratory-Based Rabies Diagnostic Testing. In: JACKSON, A. C. **Rabies**. Third Edition. Canada: Elsevier, 2013. p. 409-459.

HAMPSON K.; COUDEVILLE L.; LEMBO T.; SAMBO M.; KIEFFER A.; ATTLAN M.;

BARRAT J.; BLANTON J. D.; BRIGGS D.J.; CLEAVELAND S.; COSTA P.; FREULING C.M.; HIBY E.; KNOPF L.; LEANES F.; MESLIN F.X.; METLIN A.; MIRANDA M.E.; MÜLLER T.; NEL L.H.; RECUENCO S.; RUPPRECHT C.E.; SCHUMACHER C.; TAYLOR L.; VIGILATO M.A.; ZINSSTAG J.; DUSHOFF J. Estimating the global burden of endemic canine rabies. Global Alliance for Rabies Control Partners for Rabies Prevention. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. 1-20, 2015. Doi: 10.1371/journal.pntd.0003709.

HAYMAN, D. T., BANYARD, A. C., WAKELEY, P. R., HARKESS, G., MARSTON, D., WOOD, J. L., CUNNINGHAM, A.A.; FOOKS, A.R. A universal real-time assay for the detection of Lyssaviruses. **Journal of virological methods**, v. 177, n. 1, p. 87-93, 2011.

HEMACHUDHA, T.; WACHARAPLUESADEE, S.; LUMLERTDAECHA, B.; ORCIARI, L. A.; RUPPRECHT, C. E.; LA-ONQPANT, M.; JUNTRAKUL, S.; DENDUANGBORIPANT, J. Sequence analysis of rabies virus in humans exhibiting encephalitic or paralytic rabies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 7, p. 960–966, May, 2013.

HEMACHUDHA, T.; LAOTHAMATAS, J.; RUPPRECHT, C. E. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. **The Lancet Neurology**, v. 1, n. 2, p. 101-109, 2002.

HILL, J.E.; SMHIMDT, J.D. Bats: a natural history**. London: British Museum of Natural History**, 1984. 243p.

HUDSON, L. C.; WEINSTOCK, D.; JORDAN, T.; BOLD-FLETCHER, N. O. Clinical presentation of experimentally induced rabies in horses. **Journal of Veterinary Medicine**, Series B, v. 43, n. 1- 10, p. 277-285, 1996.

HUGHES, G. J.; SMITH, J. S.; HANLON, C. A.; RUPPRECHT, C. E. Evaluation of a *TaqMan* PCR assay to detect rabies virus RNA: influence of sequence variation and application to quantification of viral loads. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 1, p. 299-306, 2004.

IAMAMOTO, K. **Diagnóstico da raiva e das encefalites equinas do Leste e Oeste em equídeos pelo emprego da técnica de multiplex *hemi-nested* RT-PCR**. 2011. 108 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍTICA. **Tabela 3939 – Efetivo por tipo de rebanho – SIDRA**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939/>. Acesso em: 07 fev. 2019.

ICTV. INTERNAIONAL COMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. 2018. Disponível em: < https://talk.ictvonline.org/taxonomy/.>. Acesso em: 08 fevereiro 2018.

IRVIN, A. D.; M. A. The epidemiology of wildlife rabies. **The Veterinary Record**, v. 87, p. 333-348, September, 1970.

JACKSON, A.C. Current and future approaches to the therapy of human rabies. **Antiviral research**. Canada, v. 99, n. 1, p. 61-67, July, 2013. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.01.003.

KNOBEL D. L; CLEAVELAND S.; COLEMAN P. G.; FÈVRE E. M; MELTZER M .I.; MIRANDA M .E.; SHAW A.; ZINSSTAG J.; MESLIN F. X. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 5, p. 360-368, May, 2005.

KOTAIT, I.;CARRIERI, M. L.; TAKAOKA, N. Y. **Raiva –** Aspectos gerais e clínica. Instituto Pasteur, São Paulo, 2009. 49 p. (Manuais, 8).

KOTAIT, I.; NOGUEIRA FILHO, V. S.; SOUZA, M. C. A. M.; CARRIERI, M. L.; GOMES, M.N.; PERES, N.F. Manual de controle da raiva dos herbívoros. Instituto Pasteur, São Paulo, 2010. 58 p. (Manuais, 9).

LANDIS, J. R.; KOCK, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-174, 1977.

LÉCHENNE, M.; NAÏSSENGAR, K.; LEPELLETIER, A.; ALFAROUKH, I. O.; BOURHY, H.; ZINSSTAG, J.; DACHEUX, L. Validation of a rapid rabies diagnostic tool for field nsurveillance in developing countries. **PLoS Neglected Tropical Diseases,** v. 10, n.10, Oct 2016. Doi: doi.org/10.1371/journal.pntd.0005010

LEUNG, A. KC.; DAVIES, H. D.; HON, K. E. Rabies: epidemiology, pathogenesis, and prophylaxis. **Advances in therapy**, v. 24, n. 6, p. 1340-1347, 2007.

LIMA, R.A.S.; CINTRA, A.G. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. Brasília: MAPA, 2016. 53 p.

MANI, R. S.; MADHUSUDANA, S. N.; MAHADEVAN, A.; REDDY, V.; BELLUDI, A. Y.; SHANKAR, S. K. Utility of real- time Taqman PCR for antemortem and postmortem diagnosis of human rabies. **Journal of medical virology**, v. 86, n. 10, p. 1804-1812, 2014.

MAYES, B.; RUPPRECHT, C. E. Direct Fluorescent Antibody Test for Rabies Diagnosis. In:RUPPRECHT, C.E.; NAGARAJAN, T. (Eds.).**Current laboratory techniques in rabies diagnosis, research, and prevention. v. 2.** San Diego:Elsevier, 2015. p. 83-92.

MCELHINNEY, L. M.; MARSTON, D. A.; BROOKES, S. M.; FOOKS, A. R. Effects of carcase decomposition on rabies virus infectivity and detection. **Journal of Virological Methods**, v. 207, p. 110-113, 2014.

MESLIN, F. X-; KAPLAN, M. M. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: MESLIN, F. – X; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). **Laboratory techniques in rabies.**4. Ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 9-27.

NADIN-DAVIS, S. A.; SHEEN, M.; WANDELER, A. Development of real- time reverse transcriptase polymerase chain reaction methods for human rabies diagnosis. **Journal of medical virology**, v. 81, n. 8, p. 1484-1497, 2009.

NAGARAJ, T.; VASANTH, J. P.; DESAI, A.; KAMAT, A.; MADHUSUDANA, S. N.; RAVI, V. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. **Journal of clinical virology**, v. 36, n. 1, p. 17-23,

2006.

ORCIARI, L. A.; NIEZGODA, M.; HANLON, C. A.; SHADDOCK, J. H.; SANDELIN, D. W.; YAGER, P. A.; RUPPRECHT, C. E. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. **Vaccine**, v. 19, p. 4511-4518, 2001.

OLIVEIRA, R. N. **Vírus da raiva em morcegos insetívoros: implicações em epidemiologia molecular da diversidade dos genes codificadores da nucleoproteína e glicoproteína**. 2009. 81 p. Dissertação. (Mestre em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

PEIXOTO, Z. M. P.; CUNHA, E. M. S.; SACRAMENTO, D. R. V.; SOUZA, M. C. A. M.; DA SILVA, L. H. Q.; GERMANO, P. L.; KROEFF, S. S.; KOTAIT, I. Rabies Laboratory Diagnosis: peculiar features of samples from equine origin**. Brazilian Journal of Microbiology**,v. 31, n. 1, p.72-75, April, 2000.

PIMENTEL, L. A.; OLIVEIRA, D. M. D.; GALIZA, G. J.; REGO, R. O. D.; DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F. Doenças do sistema nervoso central de equídeos no semi-árido. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 589-597, 2009.

SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO, N. PCR Technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. **Molecular and Cellular Probes**, v. 5, n. 3, p. 229-240, 1991.

SAZIMA, Ivan. Aspectos do comportamento alimentar dos morcegos hematófago, *Desmodus rotundus*. **Boletim de Zoologia**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 97-120, 1978.

SAA- SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA)**.** Resolução SAA n^{0} 29, de 24 de setembro de 2001. Publicado em 25 de setembro 2001. Sancionado em 24 de setembro de 2001. **Diário Oficial - Poder Executivo - Estado de São Paulo - Seção I.** Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/resolucao-saa-29-de-24-09-2001,90.html >. Acesso em: 12 fev. 2019.

SECRETÁRIA DE SAÚDE DA BAHIA (SESAB). Divep – Suvisa. **Boletim epidemiológico da raiva na Bahia,** Salvador, v.1, n.1, Janeiro, 2019. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2018/02/boletimRaivaJan2019.pdf >. Acesso em: 14 fev. 2019

SCHNEIDER, M. C. **Estudo de avaliação sobre área de risco para a raiva no Brasil**. 1990. 230p. Dissertação de Mestrado - Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, 1990.

SHUANGSHOTI, S.; THEPA, N.; PHUKPATTARANONT, P.; JITTMITTRAPHAP, A.; INTARUT, N.; TEPSUMETHANON, V.; WACHARAPLUESADEE, S.; THORNER, P.S.; HEMACHUDHA, T. Reduced viral burden in paralytic compared to furious canine rabies is associated with prominent inflammation on the brainstem level. **BMC** Veterinary Research, v. 14, p. 9-31, 2013.

SILVA, M.; RIET-CORREA, F.; GALIZA, G. J.; AZEVEDO, S. S.; AFONSO, J. A.; GOMES, A. A. Distribuição do vírus rábico no sistema nervoso central em ruminantes naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 940-944, 2010.

SILVA, R. A.; SILVA, N. M.; MENEZES, P. R. V. Ocorrência do vírus da raiva na medula e no bulbo de equinos na doença natural e sua ausência nas diferentes regiões do sistema nervoso central e outros tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 9, n. 7, p. 29-31, 1974.

STRIEGEL, P.; GENETZKY, R. M. Signs of rabies in horses: A clinical review. **Mod Vet Pract**, 12, p. 983-985, 1983.

SMITH, L. L.; CLARE, D. A. A clinical note on equine rabies. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 13, n. 8, p. 193, 1972.

SMITH, J. S. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 166-176, 1996.

TADDEI, V. A.; GONÇALVES, C. A.; PEDRO, W. A.; TADDEI, W. J.; KOTAIT, I.; ARIETA, C. Distribuição do morcego vampiro *Desmodus rotundus (Chiroptera, Phyllostomidae*) no Estado de São Paulo e a raiva dos animais domésticos.**Publicação Especial Secretaria Agricultura Abastecimento de São Paulo.** 1991. 107 p.

TRIMARCHI, C.V.; NADIN-DAVIS, S.A. Diagnostic Evaluation. In: JACKSON A.C.; WUNNER, W.H. (Eds.). **Rabies** second ed. 2007. Elsevier. p. 411-471.

UIEDA, W. The common vampire bat in urban environments from Southeastern Brazil. **Chiroptera Neotropical**, Departamento de Zoologia Instituto Biológico. UNESP Botucatu, v. 1, n. 2, p. 22-24, Dec,1995.

WACHARAPLUESADEE, S.; SUTIPANYA, J.; DAMRONGWATANAPOKIN, S.; PHUMESIN, P.; CHAMNANPOOD, P.; LEOWIJUK, C.; HEMACHUDHA, T. SUPAPORN. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. **Journal of virological methods**, v. 151, n. 2, p. 317-320, 2008.

WACHARAPLUESADEE, S.; HEMACHUDHA, T. Ante-and postmortem diagnosis of rabies using nucleic acid-amplification tests. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 2, p. 207-218, 2010.

WADHWA, A.; WILKINS, K.; GAO, J.; CONDORI, R. E. C.; GIGANTE, C. M.; ZHAO, H.; Ma, X.; Ellison, J. A.; Greenberg, L.; Velasco-Villa, A.; ORCIARI, L. A pan-Lyssavirus Taqman real-time RT-PCR assay for the detection of highly variable rabies virus and other lyssaviruses. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005258, 2017. Doi: 10.1371/journal.pone.0197074.

WAKELEY, P. R.; JOHNSON, N.; MCELHINNEY, L. M.; MARSTON, D.; SAWYER, J.; FOOKS, A. R. Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2786-2792, 2005.

WEBSTER, W. A. A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 3, p. 367-369, 1987.

WILLOUGHBY, R. E.; TIEVES, K. S.; HOFFMAN, G. M.; GHANAYEM, N. S.; AMLIE-LEFOND, C. M.; SCHWABE, M. J.; CHUSID, M. J.; RUPPRECHT, C. E. Survival after treatment of rabies with induction of coma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 24, p. 2508–2514, 2005.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. technical report series. 1012 – **WHO expert consultation on rabies – Third report**. Geneva: World Health Organization, 2018.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory techniques in rabies – Fifth edition**. Geneva: World Health Organization, 2018.

WUNNER, W.H.; CONZELMANN, K.K.; Rabies Virus. In: JACKSON, A.C**. Rabies Scientific Basis of the Disease and its Management**. 3rd edition. San Diego: Academic Press, 2013, p.17–60.

ANEXOS

Anexo A – Resultado das amostras positivas e negativas para a raiva nas técnicas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em cultivo celular (IVCC), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase tempo real (RT-qPCR) nas amostras do sistema nervoso central de equinos

	IFD	IVCC	RT- PCR	RT-qPCR		IFD	IVCC	RT-PCR	RT-qPCR
2288/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**5643/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO
2293/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	**5715/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
2465/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	**5731/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO
2467/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	**6243/17**	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
2568/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**6268/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO
2683/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**6312/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
2698/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	**6372/17**	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
2769/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**6556/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO
3038/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**6625/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3057/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	**6646/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3157/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	**6767/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3367/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	**6884/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3439/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**6981/17**	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
3464/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	**6982/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3465/17	INCONCLUSIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	**6994/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3533/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	**6995/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3651/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	**7007/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3816/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	**7035/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4050/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**7126/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4077/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	**7509/17**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4128/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**114/18**	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
4226/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**215/18**	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
4229/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	**430/18**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4491/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**510/18**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4594/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	**518/18**	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
4696/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	**526/18**	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
4764/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**556/18**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4784/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**880/18**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4872/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**987/18**	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	NEGATIVO
4873/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	**994/18**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4905/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**1249/18**	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	NEGATIVO
4975/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	**1318/18**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
5084/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	**1469/18**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
5269/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	**1470/18**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO
5302/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**1485/18**	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
5305/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	**1916/18**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
5307/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	**1917/18**	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
5331/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	**1918/18**	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
5345/17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	**1933/18**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
5596/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	**2031/18**	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO

Fonte: Souza, T.C.P.(2019).

Anexo B – Resultados obtidos pela técnica de imunofluorescência direta (IFD) para o diagnóstico da raiva

	Bulbo	Cerebelo	Córtex	Hipocampo	Médula Espinhal	Médula Cervical	Medula Lombar	Mesencéfalo	Ponte	Tálamo	Tronco Encefálico
2293/17	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NT	NT	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NT
2465/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
2467/17	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
2698/17	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	NT
3157/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
3367/17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NT
3464/17	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NT
3465/17	NT	NT	INCONCLUSIVO	NEGATIVO	NT	NT	NT	INCONCLUSIVO	NT	INCONCLUSIVO	NT
3533/17	NT	NT	NEGATIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NT
3651/17	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	NT	POSITIVO	NT
4077/17	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
5269/17	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
5305/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NT
5307/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
5596/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
6243/17	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NT
6372/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
6981/17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
114/18	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NT	NT	NT	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NT
215/18	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
518/18	NT	NT	NEGATIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	NT	NT	NT	POSITIVO
526/18	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	INCONCLUSIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NT
1485/18	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	NT	POSITIVO	NT
1917/18	INCONCLUSIVO	NEGATIVO	INCONCLUSIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
1918/18	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NT
Total de Positivos	12	14	16	19	2	1	1	19	15	16	1

Fonte: Souza, T.C.P.(2019).

Anexo C – Resultados obtidos pelos métodos moleculares: Ciclo de quantificação (Cq) do RT-qPCR e as diferenças entre as estruturas do SNC

	Bulbo	Cerebelo	Córtex	Hipocampo	Médula Espinhal	Médula Cervical	Medula Lombar	Mesencéfalo	Ponte	Tálamo	Tronco Encefálico
2293/17	31,14	34,2	34,8	35,2	34,2	NT	NT	32,7	33,7	21,76	NT
2465/17	22	21,44	17,7	21,64	NT	NT	NT	17,43	22,26	18,71	NT
2467/17	NT	NT	20,5	29,3	NT	NT	NT	18,6	38	22,3	NT
2698/17	24,8	32,1	31,9	33,5	NT	NT	NT	25,2	27,4	25,5	NT
3157/17	28,5	21,8	20	19,3	NT	NT	NT	20	26,2	22,9	NT
3367/17	27,1	31,3	28,5	32,7	NT	NT	NT	24	21,7	25,3	NT
3464/17	38,6	27,8	27,9	31,7	NT	NT	NT	21,7	22,4	29,9	NT
3465/17	NT	NT	24,9	28,3	NT	NT	NT	24,3	NT	23	NT
3533/17	NT	NT	26,9	31	NT	NT	NT	26,3	25,6	27,7	NT
3651/17	NT	18,9	19,8	18,4	NT	NT	NT	25	NT	18,7	NT
4077/17	NT	NT	25,9	26,7	NT	NT	NT	25,6	23,5	32,7	NT
5269/17	22,7	29,1	34,6	31,4	NT	NT	NT	22,7	23	36	NT
5305/17	24,2	Indeterminado	30,6	32,3	NT	NT	NT	9	27	4,7	NT
5307/17	23,7	22,2	21,2	24,5	23,5	NT	NT	34,3	26,9	25,4	NT
5596/17	25,1	Indeterminado	32,2	37,8	NT	NT	NT	23,8	27,6	30,1	NT
6243/17	31,6	31,5	25,8	Indeterminado	NT	32,2	27,8	23,1	30,6	26,3	NT
6372/17	20,2	23,8	21,3	22,1	NT	NT	NT	19,5	21	30,5	NT
6981/17	18,4	23,1	22,6	26,2	NT	NT	NT	18,9	19,9	21	NT
114/18	23,8	29,5	28,6	28,8	NT	NT	NT	29,3	26,9	28,5	NT
215/18	20,8	22,5	21	22,9	NT	NT	NT	29	23	21,7	NT
518/18	NT	NT	25,6	23,1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	29,6
526/18	24,6	27,1	28,8	29,2	NT	NT	NT	20,3	26,7	24,6	NT
1485/18	NT	NT	27,8	25	NT	NT	NT	24,8	NT	27,9	NT
1917/18	22,7	29	30,3	30,2	NT	NT	NT	26,7	24,5	29,2	NT
1918/18	28,9	30,8	23,4	29,2	NT	NT	NT	21,7	23,7	25,4	NT
Total de Positivos	16	16	17	16	2	1	1	19	17	15	1

Fonte: Souza, T.C.P.(2019).

Legenda: NT: Ausente Positivas: pela RT-qPCR Cq<35; Inconclusivas: Cq>35 ou Cq<40; Negativas: Cq>40 ou indeterminado; NT: Ausente.