NATALIA HELENA FRADA CENTOAMORE

**Estudo da neuroinvasividade do vírus da raiva em amostras de sistema
nervoso central de bovinos**

São Paulo
2017

NATALIA HELENA FRADA CENTOAMORE

Estudo da neuroinvasividade do vírus da raiva em amostras de sistema nervoso central de bovinos

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. Enio Mori

São Paulo

2017

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. 3481
FMVZ

Centoamore, Natalia Helena Frada
Estudo da neuroinvasividade do vírus da raiva em amostras de sistema nervoso
central de bovinos / Natalia Helena Frada Centoamore. -- 2017.
86 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Enio Mori.

1. Raiva bovina. 2. Sensibilidade. 3. Especificidade. 4. Técnicas diagnósticas.
5. Epidemiologia. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da neuroinvasividade e neurovirulência do vírus da raiva em amostras de sistema nervoso central de bovinos", protocolada sob o CEUA nº 7533040215, sob a responsabilidade de **Enio Mori e equipe; Natalia Helena Frada Centoamore; Claudia Madalena Cabrera Mori; Karen Miyuki Asano; Karin Correa Scheffer Ferreira; Keila Iamamoto Nogi; Paulo Cesar Maiorka; Samira Maria Achkar Pinheiro; Willian de Oliveira Fahl** - 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 01/07/2015.

We certify that the proposal "Study of neuroinvasiveness and neurovirulence of the rabies virus in the central nervous system of cattle samples", utilizing 50 Bovines (50 males), protocol number CEUA 7533040215, under the responsibility of **Enio Mori and team; Natalia Helena Frada Centoamore; Claudia Madalena Cabrera Mori; Karen Miyuki Asano; Karin Correa Scheffer Ferreira; Keila Iamamoto Nogi; Paulo Cesar Maiorka; Samira Maria Achkar Pinheiro; Willian de Oliveira Fahl** - 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 07/01/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **março** a **março**

Área: **Patologia**

Origem: **Amostras biológicas estocadas**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos**

idade: **a**

N: **50**

Linhagem: **N/A**

Peso: **a**

Resumo: Serão utilizadas amostras de encéfalo (tálamo, córtex, hipocampo, cerebelo e tronco encefálico) de bovinos naturalmente infectados, provenientes da Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur, durante o período de abril de 2015 a abril de 2016. Todas as amostras utilizadas serão colhidas para fins de diagnóstico da raiva e posteriormente utilizadas para compor casuística. As amostras testadas serão analisadas pelas seguintes técnicas: detecção antigênica pelas técnicas de imunofluorescência direta e imunohistoquímica (IHQ); isolamento viral em cultura celular (linhagem N2A) e por inoculação em camundongos pela via intracerebral; detecção do RNA viral pela RT-PCR convencional e quantificação da carga viral pela RT-PCR em tempo real (RT-qPCR). Serão realizados estudos comparativos da sensibilidade e especificidade diagnóstica destas diferentes técnicas. Além da análise da intensidade e verificação dos diferentes tipos de lesões histológicas nas diversas estruturas de SNC (neurovirulência), será importante verificar a distribuição antigênica ou presença de RNA viral nas diferentes porções do SNC (neuroinvasividade) pelas técnicas da IHQ ou RT-PCR e RT-qPCR, respectivamente.

Local do experimento:

São Paulo, 23 de fevereiro de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CENTOAMORE, Natalia Helena Frada

Título: **Estudo da neuroinvasividade do vírus da raiva em amostras de sistema nervoso central de bovinos**

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 Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus avós **Oswaldo Frada, Therezinha de Lima Beber Frada, Osvaldo Centoamore e Maria Aparecida Tondi Centoamore** *in memoriam*, pois sei que se estivessem presentes, certamente se alegrariam com mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Liana** e **Oswaldo José**, pelo amor, suporte, incentivo e conselhos que sempre me deram em toda minha vida. Sem eles certamente não chegaria até aqui.

Ao meu irmão **Ivo Daniel**, que por mais “chata” que eu seja com ele, não fica bravo por muito tempo e sempre se interessa em saber como foi meu dia.

Aos meus **familiares**, por sempre me incentivarem a crescer pessoalmente e profissionalmente e se alegrarem a cada nova conquista.

Ao meu orientador Prof. Dr.**Enio Mori**, pela confiança depositada em meu trabalho, dedicação, presença, envolvimento e empenho, importantes para a conclusão deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. **Cláudia Mori**, por abrir as portas do seu laboratório, permitindo que eu pudesse realizar parte do trabalho necessário e o convívio com ótimas pessoas, em especial **Dennis, Leonardo** e **Mariana Aranha** pela ajuda dada e pelas conversas.

A todos os pesquisadores do **Instituto Pasteur**, por terem me acolhido tão bem desde os tempos do Aprimoramento Profissional, sempre torcerem pelo meu crescimento e conhecimentos transmitidos que só acrescentaram em minha formação, em especial **Karen Miyuki Asano, Keila Iamamoto Nogi, Willian de Oliveira Fahl, Karin Corrêa Scheffer Ferreira, Samira Maria Achkar, Fernanda Guedes Luiz, Elaine Raniero Fernandes, Graciane Maria Medeiros Caporale, Juliana Castilho Galera Kawai** e **Rafael de Novaes Oliveira**.

A todos os funcionários do **Instituto Pasteur**, por terem me acolhido tão bem desde os tempos do Aprimoramento Profissional e sempre torcerem pelo meu crescimento, em especial **Kátia Cristina, Maria Aparecida da Silva (Cidoka)** e **Fátima**.

A todos os amigos que fiz durante o aprimoramento, principalmente **Thais, Patrícia, Marcélia, Viviane, Tatiane** e **Ingrid**, por todas as horas dentro e fora do laboratório.

Aos demais **amigos** que sempre estão por perto, apesar de qualquer distância imposta pelas circunstâncias da vida, especialmente **Mariana Bassanello, Débora Souza, Débora Santos, Daniela, Fernanda, Carla, Tahina e Luíza.**

À Prof^a. Dr^a. **Mary S. Varaschin**, da Universidade Federal de Lavras, por ceder o anticorpo primário policlonal anti-vírus da raiva utilizado para a realização da imunohistoquímica.

À **Luciana Hardt**, diretora do Instituto Pasteur, por disponibilizar todo o apoio para que a realização deste trabalho fosse possível.

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.

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

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

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente ocorre”.

Benjamin Disraeli

RESUMO

CENTOAMORE, N.H.F. **Estudo da neuroinvasividade do vírus da raiva em amostras de sistema nervoso central de bovinos.** [Study of the neuroinvasiveness of the rabies virus in samples of central nervous system of cattle]. 2017. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A raiva é uma encefalomielite aguda causada por um vírus da ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* e espécie *Rabies virus* (RABV). É um vírus RNA de fita simples, senso negativo que acomete todas as espécies de mamíferos. Seu diagnóstico é obtido de modo definitivo por técnicas laboratoriais. A imunofluorescência direta (IFD) é uma prova de triagem rápida, considerada padrão ouro pela OMS e OIE, pois possui alta sensibilidade e especificidade diagnóstica. Esta técnica utiliza como teste confirmatório o isolamento viral em camundongos (IVC) ou em cultura de células (IVCC). Uma vez que o RABV não infecta todas as estruturas do sistema nervoso central (SNC) de modo uniforme, a detecção deste agente pode ter resultados variáveis. Algumas situações exigem o desenvolvimento e implantação de metodologias alternativas, tais como transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) e imunohistoquímica (IHQ), que possuem vantagens e apresentaram resultados bastante promissores. Para tanto, foram utilizadas amostras de SNC[tálamo, córtex, hipocampo, cerebelo, tronco encefálico (bulbo, ponte e mesencéfalo) e medula cervical]de 127 bovinos provenientes da Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur, durante o período de março de 2015 a abril de 2016. As diferentes regiões do SNC dos animais foram identificadas e alíquotas foram separadas para a realização das técnicas de identificação viral, totalizando 689 fragmentos. A presença viral foi observada pela IFD e confirmada tanto pelo IVC quanto pelo IVCC. A distribuição do vírus pelas diferentes porções do SNC foi observada pelas técnicas de IFD, IHQ e RT-PCR para detecção do gene N em 40 animais que foram considerados positivos. Os 40 bovinos positivos na IFD confirmaram sua positividade na IHQ e IVC, apresentando concordância de 100% dos resultados. Entretanto houve diferença em relação aos resultados dos isolamentos virais, uma vez que, dos 38 animais positivos que foram submetidos a ambas as técnicas, três foram negativos para a presença do RABV no IVCC, indicando uma concordância de 92,1%, (35/38) quando comparado ao IVC. Em relação às técnicas moleculares houve diferenças, a RT-PCR apresentou positividade de 100% (40/40), enquanto que a RT-qPCR observou-se que 97,5% (39/40) dos bovinos foram positivos. Na IFD, de modo geral, não houve disparidade entre os fragmentos em relação à

positividade, porém ocorreu diferença quando se analisou a intensidade de fluorescência entre os fragmentos. Quando comparadas, a IHQ e a IFD apresentaram resultados semelhantes, embora a IHQ tenha apresentado positividade em 100% fragmentos (209/209) e a IFD em 99,51% dos fragmentos (205/206). Conclui-se, pelos resultados obtidos, diferenças na intensidade da distribuição viral e na concentração de RNA viral nas diferentes porções do SNC (padrões de neuroinvasividade) em bovinos; fato este que poderia interferir nos resultados obtidos no diagnóstico de rotina da raiva.

Palavras-chave: Raiva bovina. Sensibilidade. Especificidade. Técnicas diagnósticas. Epidemiologia.

ABSTRACT

CENTOAMORE, N.H.F. **Study of the neuroinvasiveness of the rabies virus in samples of central nervous system of cattle.** [Estudo da neuroinvasividade do vírus da raiva em amostras de sistema nervoso central de bovinos]. 2017. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Rabies is an acute encephalomyelitis caused by a virus belonging to the Mononegavirales order, Rhabdoviridae family, Lyssavirus genus and Rabies virus (RABV) species. It is a single-stranded RNA virus, negative sense that affects all species of mammals. The definitive diagnosis is obtained by laboratory techniques. Direct fluorescent antibody test (dFAT) is a rapid screening, considered the gold standard by WHO and OIE, as it has high diagnostic sensitivity and specificity. However, it's recommended the mouse inoculation test (MIT) or rabies tissue culture infection test (RTCIT) as a confirmatory test. Once RABV does not infect all central nervous system (CNS) structures uniformly, the detection of this agent may have varying results. Some situations require the development and implementation of alternative methods such as RT-PCR, RT-qPCR and immunohistochemistry (IHC), which have advantages and showed very promising results. Therefore, CNS structures [thalamus, cortex, hippocampus, cerebellum, brainstem (medulla, pons and midbrain) and cervical cord] from 127 cattle were selected from the Rabies Diagnostics Section of the Instituto Pasteur during the period March 2015 to April 2016. The different CNS structures were identified and aliquots were separated for carrying out the viral identification techniques, totalizing 689 structures. The viral presence was observed by dFAT and confirmed by both the MIT and the RTCIT. The distribution of the virus by different portions of the CNS was observed by dFAT, IHC and RT-PCR for detection of the N gene in 40 animals considered positive. The 40 positive cattle in the dFAT confirmed their positivity on IHC and MIT, with agreement of 100% of the results. However there was a difference from the viral isolation since the 38 positive animals tested in both techniques, three were negative for the presence of RABV in RTCIT indicating an agreement of 92.1% (35/38) when compared to MIT. The dFAT, in general, showed no disparity among the fragments relative to their positivity, however, a difference was observed when analyzing the fluorescence intensity between the fragments. When compared IHC and dFAT presented similar results, although the IHC has presented a 100% positivity in the fragments (209/209) and 99.51% in dFAT (205/206). Regarding the molecular techniques, RT-PCR showed positivity of 100% (40/40), meanwhile RT-qPCR

showed 97,5% (39/40) among the positive animals studied. In conclusion, the results suggest that there is variability in the intensity of virus distribution and in the virus concentration in different parts of the CNS (neuroinvasiveness patterns) in cattle. This fact could affect the results obtained in the diagnosis of rabies routine.

Keywords: Bovine rabies. Sensibility. Specificity. Diagnostic techniques. Epidemiology.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11

INTRODUÇÃO GERAL	15
Objetivo geral	17
Objetivos específicos	17

Aspectos clínicos e epidemiológicos da raiva bovina apresentados na casuística de diagnóstico laboratorial do Instituto Pasteur no período de março de 2015 a março de 2016.	18
---	----

INTRODUÇÃO	18
MATERIAIS E MÉTODOS	21
Material	21
Métodos	21
RESULTADOS	22
DISCUSSÃO	28
CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS.....	32
ANEXOS A	36

Avaliação do desempenho de diferentes técnicas laboratoriais realizadas para o diagnóstico da raiva em amostras de bovinos.....	41
---	----

RESUMO.....	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAIS E MÉTODOS	46
Material	46
Métodos	46
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXOS B.....	62

Padrão de neuroinvasividade do vírus da raiva (RABV) no sistema nervoso central (SNC) de bovinos naturalmente infectados avaliados por diferentes técnicas diagnósticas.	65
RESUMO	65
INTRODUÇÃO	66
MATERIAIS E MÉTODOS	68
Material	68
Métodos	68
RESULTADOS	71
DISCUSSÃO	75
CONCLUSÃO	78
ANEXOS C.....	81
 CONCLUSÕES	 85
REFERÊNCIAS	85

INTRODUÇÃO GERAL

A raiva é conhecida desde a antiguidade, sendo já comum, naquela época, a referência aos cães como principais transmissores da doença através da mordedura, como descrito por Aristóteles. Um estudioso romano, Lucian, acreditava que além dos cães transmitirem raiva agredindo outros animais e humanos, estes também poderiam, ao morder outras pessoas, também disseminar a doença (SMITHCORS, 1958). Apesar de toda especulação do agente causador da raiva, somente no século XIX, Louis Pasteur conseguiu demonstrar a verdadeira causa da doença (STEELE, 1975).

Carini (1911) foi o primeiro a diagnosticar a raiva paralítica de bovinos, no estado de Santa Catarina, porém, a possível ligação entre o surto e os morcegos hematófagos foi recebida com descrença pelos pesquisadores da época. Em 1916, dois veterinários alemães (Haupt e Rehaag) foram contratados pelo Governo catarinense. Eles conseguiram identificar o vírus da raiva (RABV) no cérebro de morcegos hematófagos, contudo, a comunidade científica relutava em acreditar que fosse possível a ocorrência de casos da doença sem a presença dos cães (BRASIL, 2009).

Após diversos trabalhos na América Latina associando o morcego hematófago como transmissor da raiva, tanto a bovinos quanto a humanos, os pesquisadores da época passaram a aceitar esse fato (HURST; PAWAN, 1931; QUEIRÓZ-LIMA, 1934; TORRES; QUEIRÓZ-LIMA, 1935).

A raiva se mantém circulante na natureza por três ciclos epidemiológicos: 1) ciclo urbano, no qual os cães e gatos possuem maior importância; 2) ciclo rural, que inclui os herbívoros domésticos, considerados como hospedeiros acidentais e com menor risco de transmissão aos humanos; 3) ciclo silvestre, neste há participação de diversos hospedeiros, dependendo da fauna da região, como o sagui (*Calithrix jacchus*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) no Brasil; e 4) ciclo aéreo, refere-se aos morcegos, apesar dos morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* possuírem maior importância, das 167 espécies de quirópteros identificadas no Brasil, o RABV já foi isolado de 42 delas (KOTAIT et al., 2010).

Vale ainda salientar a importância dos herbívoros como animais sentinelas da raiva, sendo assim importantes indicadores da circulação em determinada região da variante antigênica 3 (AgV3) do RABV compatível com aquela isolada em morcegos hematófagos *D. rotundus*. Esta informação tem relevância em saúde pública, visto os casos recentes de ciclo de transmissão secundária da raiva em cães, gatos e humanos causados pela AgV3 oriunda de morcegos *D. rotundus* (BRASIL, 2016).

A raiva dos herbívoros no Brasil é considerada endêmica e sua ocorrência varia de acordo com a região do país. Alguns fatores facilitam a disseminação da enfermidade entre os herbívoros domésticos, sendo: 1) crescimento dos rebanhos, o que faz com que a disponibilidade de alimentos aumente; 2) macro modificações ambientais, como desmatamento, construção de rodovias e hidroelétricas, causando alterações no habitat dos morcegos, fazendo com que estes sejam obrigados a migrarem para outras áreas; 3) aumento da oferta de abrigos artificiais (túneis, cisternas, bueiros, casas abandonadas); 4) alguns estados brasileiros possuem menor ação de vigilância para a raiva (recursos utilizados para outras doenças, por exemplo) (BRASIL, 2009).

A patogenia da raiva em herbívoros se assemelha à observada nas demais espécies animais. Ao se alimentar do sangue de um herbívoro, o *D. rotundus* inocula o vírus, que se replicará nas células musculares no local de inoculação. Ao atingir concentrações elevadas, alcança as terminações neurais. Este período de replicação extraneural é responsável pelo período de incubação longo, variando de 30 a 90 dias (KOTAIT et al., 1998). Uma vez nas junções neuromusculares, a glicoproteína viral se ligará ao receptor nicotínico de acetilcolina, atingindo aos nervos periféricos, a partir dos quais segue um trajeto centrípeto até o sistema nervoso central (SNC). No SNC, a distribuição viral não é homogênea, por isso é importante que se encaminhe para o diagnóstico da raiva todas as estruturas. Com a intensa replicação viral no SNC, o RABV dissemina-se de modo centrífugo para os demais órgãos, incluindo as glândulas salivares.

Uma vez que ocorre a manifestação dos sinais clínicos, a evolução da enfermidade é quase sempre fatal. A raiva pode seguir dois cursos: parálitica, mais comum entre os herbívoros domésticos; ou furiosa, que leva o animal a atacar outros animais ou seres humanos (BRASIL, 2009). Normalmente, o sinal clínico inicial dos herbívoros é o isolamento do animal do restante do rebanho. Outros sinais podem ser observados no início, como aumento da sensibilidade e prurido na região da mordedura. Com a evolução da doença, os animais podem se apresentar com midríase, pelos arrepiados, sonolência, movimentos anormais das extremidades pélvicas, corrimento nasal (RONDON et al., 1995). A duração da enfermidade é de 2 a 5 dias, podendo chegar a 10 dias, sendo que o óbito ocorre por paralisia dos músculos envolvidos na respiração (ACHA; SZYFRES, 2003; BRASIL, 2009).

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Verificar a neuroinvasividade, neurovirulência e carga viral do RABV em amostras de bovinos provenientes do setor diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo, comparando diferentes técnicas diagnósticas.

Objetivos específicos

- Detectar e avaliar a distribuição do antígeno viral da raiva em amostras de SNC de bovinos (tronco encefálico, tálamo, cerebelo, córtex e hipocampo) pelas técnicas de imunofluorescência direta (IFD) e imunohistoquímica (IHQ), utilizando-se conjugado policlonal anti-raiva.
- Detectar e avaliar a distribuição do RNA viral da raiva em amostras de SNC (tronco encefálico, tálamo, cerebelo, córtex e hipocampo) de bovinos pela técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).
- Detectar, quantificar e avaliar a distribuição do RNA viral da raiva em amostras de SNC de bovinos (tronco encefálico, tálamo, cerebelo, córtex e hipocampo) pela técnica de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR).
- Comparar a sensibilidade diagnóstica das técnicas de IFD, IHQ, RT-PCR e RT-qPCR em amostras de SNC de bovinos.

Aspectos clínicos e epidemiológicos da raiva bovina apresentados na casuística de diagnóstico laboratorial do Instituto Pasteur no período de março de 2015 a março de 2016.

RESUMO

A raiva é uma doença que considerada negligenciada pelos governantes dos países em desenvolvimento, trazendo grandes impactos econômicos nas saúdes pública e animal, principalmente com os tratamentos profiláticos pré- e pós-exposição a agravos em humanos e perdas diretas e indiretas à pecuária brasileira. Com o intuito de se obter dados quanto à circulação do vírus da raiva (RABV) em bovinos no estado de São Paulo, realizou-se um estudo dos aspectos clínicos e epidemiológicos dos bovinos encaminhados ao Instituto Pasteur de São Paulo (IP/SP) durante o período de março de 2015 a março de 2016. Foram encaminhados ao IP/SP durante esse período 119 amostras de sistema nervoso central de bovinos, das quais 39 (32,8%) apresentaram diagnóstico positivo para o RABV nas técnicas diagnósticas utilizadas (imunofluorescência direta, isolamento viral em cultivo de células e isolamento viral em camundongos). Há ocorrência da doença durante o ano todo, com maior número de casos apresentados principalmente na época da primavera (setembro a novembro). Os animais jovens (até 24 meses de idade) e de aptidão leiteira foram os mais acometidos. Também foi possível verificar que o período médio de evolução da doença foi de $84,7 \pm 54,4$ horas. Dos animais positivos nos quais apresentavam informações sobre o curso da doença, em 22 casos observou-se evolução natural para o óbito, enquanto que em outros 10 foram eutanasiados. Dos 39 positivos, 20 animais apresentavam histórico de vacinação contra a raiva. No período estudado, apenas 12 municípios no estado de São Paulo apresentaram casos da enfermidade, sendo que a maioria está localizada na região fronteira ao estado de Minas Gerais, considerada como área epidêmica para a ocorrência da raiva. De acordo com a divisão por Escritório de Defesa Agropecuária, a região com maior número de casos foi a de Bragança Paulista.

Palavras-chave: raiva bovina. Estado de São Paulo. Epidemiologia. Diagnóstico laboratorial.

INTRODUÇÃO

A raiva é uma encefalite viral de evolução aguda, com letalidade de quase 100%. Estima-se que a cada ano ocorram de 40.000 a 70.000 óbitos humanos no mundo, principalmente em países em desenvolvimento (WHO, 2013). É uma zoonose capaz de

infectar todas as espécies de mamíferos, inclusive o homem. Sua evolução progressiva em humanos costuma ser rápida, seus sintomas variados e o tratamento do paciente é iniciado imediatamente após a identificação de um agravo sofrido pelo mesmo (SCHNEIDER, 1975; PLOTKIN, 2000; KOTAIT et al., 2009).

O vírus da raiva [*Rabies lyssavirus*(RABV)]é um agente do gênero *Lyssavirus* pertencente à família *Rhabdoviridae* e ordem *Mononegavirales* (ICTV, 2015). É um vírus neurotrópico, o que quer dizer que após a sua entrada e replicação em um tecido extra-neuralno hospedeiro,ele percorrerá um caminho que o conduzirá ao sistema nervoso central (SNC). O RABV é um vírus envelopado que possui genoma composto por RNA fita-simples, senso negativo e cinco proteínas estruturais, a saber: glicoproteína (G), proteína da matriz (M), nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) e RNA polimerase viral (L). Seu capsídeo possui simetria helicoidal e a proteína M faz com queessevírus possua forma semelhante a um projétil (RUPPRECHT, 1996). Como todo vírus envelopado, o RABV é sensível a agentes físicos e químicos, e deste modo, pode ser inativado por alterações de temperatura, de pH, ácidos e bases fortes e a exposição à luz solar e raios ultravioleta (BRASIL, 2008).

A raiva está presente em todo o território brasileiro e possui relevância na maioria dos estados, seja pelo seu caráter zoonótico, ou pela suaimportância econômica, uma vez que é responsável por perdas na pecuária. O ataque dos morcegos hematófagos aos bovinos acarreta sérios prejuízos, pois além dos animais mortos pela doença, os agredidos perdem peso e apresentam lesões em diversas partes do corpo, o que prejudica a qualidade do couro (ACHKAR et al., 2010).

De acordo com a OrganizaçãoPan-americanada Saúde (OPAS, 2009) as perdas econômicas diretas e indiretas anuais causadas pela raiva em herbívoros na América Latina são de US\$ 300 milhões e de US\$ 200 milhões, respectivamente. Apesar de a raiva causar grandes impactos econômicosà pecuária brasileira, uma avaliação precisa torna-se impraticável, devido à subnotificação dos casos em herbívoros ser uma realidade em todo o território nacional. Há estimativas de prejuízos econômicos da raiva em herbívoros no Brasil queindicam perdaseconômicas anuais diretas de US\$ 25 milhões e indiretas de US\$ 37,5 milhões(KOTAIT et al., 2010).

A raiva possui grande importância econômica avaliada pela mortalidade de bovinos e equinos acometidos pela doença, sendo observados 4.112casos no Brasil no período de 2011 a 2015. Já no estado de São Paulo, neste mesmo período, foram registrados 696 casos positivos em herbívoros (BRASIL, 2016a).

Além disso, esta enfermidade causa grande impacto na saúde pública refletida pela mortalidade de humanos no Brasil, 592 casos no período de 1990 a 2016 (BRASIL, 2016b) e também pelo oneroso gasto anual com tratamento profilático de pré- e pós-exposição em humanos (WHO, 2013).

Em estudo realizado por Pozzetti (2001), verificou-se a ocorrência de 1.023 casos em herbívoros no estado de São Paulo entre os anos de 1996 e 1999, sendo que estes estavam distribuídos em 118 municípios localizados principalmente na região próxima às fronteiras com os estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Gomes e Monteiro (2011) observaram 2.713 amostras de bovinos positivos para raiva durante o período de 1996 a 2003. Eles também inferiram a região do Vale do Paraíba, fronteira com o estado de Minas Gerais, como a mais suscetível ao aparecimento de focos da doença.

O estado de São Paulo foi dividido, pela Comissão Estadual do Programa de Controle da Raiva no ano de 2000, em três áreas de acordo com a ocorrência dos casos de raiva, sendo classificadas como: endêmica, epidêmica e esporádica (anexo -figura 1). Essa divisão possibilitou no passar dos anos um melhor planejamento das medidas adotadas para o controle de focos de ocorrência de raiva pelos órgãos governamentais relacionados à defesa agropecuária no estado (KOTAIT et al., 2010).

Quanto aos estados que fazem fronteira com o estado de São Paulo, o Mato Grosso do Sul registrou durante os anos de 2003 a 2012 a ocorrência de 1.765 casos de bovinos positivos. A maior ocorrência foi na região central do estado, devido a maiores formações montanhosas, que propiciam a um maior número de abrigos para os morcegos (cavernas), sendo que a área de fronteira com o estado de São Paulo foi a que apresentou o menor número de focos (MACHADO JÚNIOR, 2014).

Em relação ao estado do Paraná, em um levantamento realizado por Dognani (2014), foi observado que durante o período de 1977 a 2012, o estado registrou a ocorrência de 2.331 casos de raiva em bovinos, que se distribuíram por 47,6% do território do Paraná, principalmente nas mesorregiões Centro Oriental e Curitiba (fronteiras ao estado de São Paulo).

O estado do Rio de Janeiro possui um registro de 591 casos em bovinos, concentrados principalmente no Vale do Paraíba, divisa com São Paulo, no período de 1980 a 1992. Durante esse período, estima-se que os prejuízos foram na ordem de US\$ 17 milhões (FEITAL; CONFALONIERI, 1998). Já Meneguete (2012) relatou a ocorrência de 170 casos de bovinos positivos para raiva no período de 2007 a 2010 neste estado.

Estudo realizado por Luz (1988), com o levantamento de dados do estado de Minas Gerais no período de 1969 a 1986, determinou a ocorrência de 820 bovinos positivos para raiva em 2.498 casos de síndrome neurológica em animais (32,8%), com uma maior incidência no interior do estado e na região fronteira com os estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Já durante o período de 1976 a 1997, foram registrados 3.802 casos de bovinos positivos para raiva, indicando uma proporção de positividade de 50,5%. Além disso, neste mesmo período, 75% (543/723) dos municípios mineiros foram acometidos pela doença (SILVA et al., 2001). Dados levantados por Menezes (2008), para o período de 1998 a 2006, indicaram uma queda no número de diagnósticos e a ocorrência de 3.053 bovinos rábicos em Minas Gerais (44,42% de positividade). Oliveira et al. (2012), em estudo para se verificar as doenças neurológicas que acometem bovinos em Minas Gerais, observaram a importância da raiva entre as síndromes neurológicas, uma vez que das amostras recebidas 41,8% (1540/3703) foram diagnosticadas como positivas para raiva.

Apesar da raiva em herbívoros no estado de São Paulo ser de ocorrência comum, observa-se escassez de trabalhos recentes publicados sobre o assunto, associando aspectos relacionados ao diagnóstico laboratorial e dados de animais acometidos pela enfermidade. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi fornecer informações sobre a situação epidemiológica da ocorrência de raiva em bovinos no estado de São Paulo, no período de março de 2015 a março de 2016, tendo como base dados recebidos no Instituto Pasteur de São Paulo (IP/SP).

MATERIAIS E MÉTODOS

Material

O material utilizado para o estudo foi o sistema nervoso central (SNC) de 119 bovinos encaminhados para a Seção de Diagnóstico da Raiva do IP/SP, provenientes de diversos municípios dos Estados de São Paulo e Minas Gerais (região fronteira com o estado de São Paulo) (anexo -quadro 1), no período de março de 2015 a março de 2016. As amostras de SNC foram mantidas sob refrigeração até o momento do processamento das mesmas (anexo - figura 2).

Métodos

Técnica de imunofluorescência direta

Para a confirmação da presença do RABV, foram confeccionadas lâminas com impressões de fragmentos do SNC, que foram submetidas à técnica de imunofluorescência direta (IFD) para a pesquisa do antígeno viral, de acordo com a técnica descrita por Dean et

al. (1996). O anticorpo conjugado utilizado foi um policlonal anti-RABV, produzido no IP/SP a partir de soro de cavalo (lote 05/13 com titulação de 1:90) A leitura foi realizada no microscópio de fluorescência LEICADMBL.

Isolamento viral

O isolamento viral em camundongo(IVC) foi realizado conforme metodologia descrita por Koprowski (1996), sendo que os camundongos pertencentes à linhagem Swiss-Webster de 21 dias de idade, com peso entre 12 e 14 gramas, foram inoculados pela via intracerebral com 0,03 mL de inóculo. Foram utilizados cinco animais por amostra e os mesmos foram observados diariamente durante 30 dias. A confirmação do diagnóstico foi obtida pela técnica de IFD. Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IP/SP e pela CEUA da FMVZ-USP.

O isolamento viral em cultivo de células(IVCC) foi realizado com a utilização de células da linhagem de neuroblastomamurino 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 LEICADML de fluorescência, com lâmpada HBO-50, com aumento de 200X.

RESULTADOS

Foi observado que das 119 amostras de SNC analisadas, 39 apresentaram diagnóstico positivo nas diferentes técnicas realizadas, o que demonstrou uma positividade de 32,8%. Os bovinos positivos foram originários de municípios dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Devido à proximidade geográfica da cidade de Toledo/MG com o EDA de Bragança Paulista, essa foi incluída como pertencente a essa região (tabela 1).

O IP/SP recebeu amostras de 42 dos 645 (6,5%) municípios que compõem o Estado de São Paulo, destes apenas 12 (1,9%) possuíam amostras positivas para o RABV. A esses resultados foram adicionados os dados da Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA) do Estado de São Paulo, que obteve positividade em 7% dos municípios (45/645) e um total de 107 bovinos positivos. Deste modo, o total de bovinos positivos para o estado de São Paulo durante o período analisado foi de 145 bovinos, dos quais 26,6% (38/145) foram encaminhados para o IP/SP. Somando-se os municípios de origem das amostras positivas, foi possível observar que 8,2% (53/645) dos municípios de São Paulo possuem a circulação do vírus entre os bovinos (figura 1).

A CDA realizou um levantamento dos abrigos de morcegos, identificando 4.413 locais, dentre abrigos naturais (grutas, ocos de árvores, pedras) e artificiais (forro de telhado, casas abandonadas). A distribuição dos mesmos pode ser observada na figura 1.

Tabela1 –Municípios de origem das amostras, de acordo com a divisão por Escritório de Defesa Agropecuária (EDA), de sistema nervoso central de bovinos positivos encaminhados para a Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo no período de março de 2015 a março de 2016.

EDA	Municípios do Estado de São Paulo	Número de Casos		Abrigos de Morcegos	
Botucatu	São Manuel	1	1/1 (100%)	15	15/178 (8,4%)
	Joanópolis	3	3/6 (50%)	13	13/228 (5,7%)
Bragança Paulista	Pedra Bela	1	1/1 (100%)	16	16/228 (7,0%)
	Socorro	19	19/33 (57,6%)	37	37/228 (16,2%)
	Toledo/MG*	1	1/1 (100%)	1	1/228 (0,4%)
	Subtotal	24	24/43 (55,8%)	67	67/228 (29,4%)
Campinas	Itatiba	2	2/2 (100%)	14	14/108 (13%)
	Subtotal	2	2/5 (40%)	14	14/108 (13%)
Franca	Franca	2	2/5 (40%)	15	15/180 (8,3%)
	Patrocínio Paulista	1	1/5 (20%)	27	27/180 (15%)
	Pedregulho	1	1/3 (33,3%)	36	36/180 (20%)
	Subtotal	4	4/22 (18,2%)	78	78/180 (43,3%)
Itapeva	Barra do Chapéu	2	2/2 (100%)	8	8/168 (4,8%)
	Itararé	4	4/7 (57,1%)	27	27/168 (16,1%)
	Subtotal	6	6/9 (66,7%)	35	35/168 (20,8%)
Orlândia	Ituverava	1	1/1 (100%)	5	5/72 (6,9%)
	Nuporanga	1	1/1 (100%)	3	3/72 (4,2%)
	Subtotal	2	2/3 (66,7%)	8	8/72 (11,1%)
TOTAL		39	39/119 (32,8%)	217	217/4413 (4,9%)

* Devido à proximidade geográfica

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017.

Figura 1 – Distribuição geográfica dos bovinos positivos para raiva no Estado de São Paulo e distribuição dos abrigos de morcegos no período de março de 2015 a março de 2016. **A)** Distribuição das amostras de bovinos recebidas no Instituto Pasteur de São Paulo (IP/SP); **B)** Dados de bovinos positivos para raiva de acordo com a Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA/SP); **C)** Municípios que apresentaram casos de raiva em bovinos; **D)** Distribuição dos abrigos de morcegos (**Fonte:** Centoamore, N.H.F., 2017).

Gráfico 1 – Distribuição da positividade das amostras dos bovinos recebidas no Instituto Pasteur de São Paulo durante o período de março de 2015 a março de 2016 (**Fonte:** Centoamore, N.H.F., 2017).

Gráfico 2– Distribuição dos bovinos positivos para raiva, quanto à faixa etária (**Fonte:** Centoamore, N.H.F., 2017).

Dentre os 39 positivos foi observada uma maior positividade no período da primavera (setembro a novembro, com pico em novembro), concentrando 46,2% (18/39) dos casos (gráfico 1). Os animais recebidos eram em sua maioria jovens, com uma média de idade de $15,3 \pm 14,5$ meses, sendo o mais jovem com 2,5 meses e o mais velho com 60 meses, a

distribuição das faixas etárias pode ser observada no gráfico 2. As fêmeas foram mais acometidas (24/39 – 61,5%), assim como as raças leiteiras (64,1%).

Também foi possível verificar que o período médio de evolução da doença foi de $84,7 \pm 54,4$ horas, sendo o menor de 10 horas e o maior de 168 horas (gráfico 3). Dentre as 39 fichas analisadas dos animais positivos, 33 apresentavam informações quanto ao curso da doença e 27 quanto à vacinação dos animais, sendo possível observar que em 22 casos a doença evoluiu naturalmente para o óbito, enquanto que 10 foram eutanasiados, e 20 animais haviam sido vacinados no máximo seis meses antes do aparecimento dos sinais clínicos.

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 10 a 192 horas. Destes os bovinos eutanasiados, dois apresentaram resultados negativos no IVCC (1980-v/15 – sem informação de quando sofreu eutanásia – e 4159-v/15 – eutanasiado após 36 horas do início dos sinais clínicos).

Gráfico 3 – Duração do período de evolução da doença nos bovinos positivos para a raiva (**Fonte:** Centoamore, N.H.F., 2017).

Os resultados obtidos pela IFD foram confirmados pelas técnicas de isolamento viral (quadro 1 e anexo – quadro 2). Quanto às amostras que não foram inoculadas em cultivo celular, foram consideradas inadequadas para este fim, pois se encontravam em avançado estado de autólise, fato que impossibilitou o diagnóstico por essa técnica.

Quadro 1 – Resultado da imunofluorescência direta (IFD), de isolamento viral em cultivo celular (IVCC) e isolamento viral em camundongos (IVC) nas amostras de sistema nervoso ventral de bovinos.

	IFD	IVCC	IVC	Óbito
1168-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
1172-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
1310-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
1315-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Eutanásia
1316-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Eutanásia
1382-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
1492-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Sem informação
1717-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
1718-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
1934-v/15	Positivo	Impossibilitado	Positivo	Morte natural
1980-v/15	Positivo	Negativo	Positivo	Eutanásia
2373-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
2377-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
2556-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
2753-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Eutanásia
2923-v/15	Positivo	Negativo	Positivo	Sem informação
3304-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Eutanásia
3339-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
3469-v/15	Positivo	Impossibilitado	Positivo	Morte natural
3472-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Sem informação
3523-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
3585-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
3716-v/16	Positivo	Positivo	Positivo	Sem informação
3814-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
3819-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Eutanásia
3854-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
3990-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
3992-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Eutanásia
4063-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Sem informação
4064-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Eutanásia
4155-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
4159-v/15	Positivo	Negativo	Positivo	Eutanásia
4192-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
159-v/16	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
234-v/16	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural
366-v/16	Positivo	Positivo	Positivo	Sem informação
413-v/16	Positivo	Positivo	Positivo	Eutanásia
525-v/16	Positivo	Positivo	Positivo	Sem informação
573-v/16	Positivo	Positivo	Positivo	Morte natural

Impossibilitado: amostra autolisada

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017.

Foram observados um período de incubação (PI) médio de $10,5 \pm 2,4$ dias, o período mínimo foi de 6 dias e o máximo de 16 dias, e uma mortalidade de 97,4% dos camundongos inoculados (190/195). O período de morbidade médio foi de $1,6 \pm 0,63$ dias, sendo o mínimo de um dia e o máximo de 6 dias (anexo – Tabela 1).

DISCUSSÃO

A diferença observada quanto aos municípios com bovinos positivos ao se comparar o IP/SP (12/645) e CDA/SP (45/645) pode ser explicada pela natureza dos profissionais responsáveis pelo encaminhamento de amostras. Isto ocorre, pois o IP/SP recebe material de SNC enviado por médicos veterinários da rede oficial das Secretarias de Saúde municipais, enquanto que os demais laboratórios do estado que realizam o diagnóstico da raiva recebem amostras de SNC provenientes de médicos veterinários vinculados à CDA/SP. Apesar de um menor número de municípios encaminharem amostras para o IP/SP, esta instituição tem grande importância no diagnóstico dessa doença, uma vez que recebe 37,94% (118/311) das amostras encaminhadas para o diagnóstico da raiva no estado de São Paulo, além de ser responsável por 26,6% dos bovinos positivos para a doença.

O número de municípios afetados com raiva em bovinos no presente experimento é inferior aos que podem ser encontrados em levantamentos realizados anteriormente. Pozzetti (2001) identificou 118 municípios com presença dessa enfermidade em herbívoros de 1996 a 1999. Já Queiroz et al. (2009) constataram a existência de raiva em bovinos em 138 municípios pertencentes à região de Araçatuba. É importante que se realize estudos em períodos de tempo maiores para que se avalie a possibilidade de tendência de diminuição de municípios positivos ou de redução do envio de amostras, fato este já observado em Minas Gerais por Oliveira et al (2012).

Das amostras analisadas neste estudo e encaminhadas ao IP/SP, 76,2% (30/39) das positivas se concentram na área considerada epidêmica e fronteira com o estado de Minas Gerais, indicando que essa é ainda uma região que demanda ações constantes de vigilância, como já foi anteriormente observado em outros estudos (LUZ, 1988; POZZETTI, 2001).

Apesar da presença de casos de raiva em todo país, há variações regionais quanto à proporção de casos de bovinos positivos, como observado nos seguintes trabalhos: 15,92% no Mato Grosso do Sul (RIBAS et al., 2013), 48,7% no semiárido nordestino (GALIZA et al., 2010), 41,8% em Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2012) e 30,6% no Paraná (DOGNANI, 2014).

Diferenças quanto à ocorrência também foram observadas em diferentes regiões do estado de São Paulo. Queiroz et al. (2009) verificaram que 16% dos bovinos foram acometidos na região de Araçatuba, enquanto que na região de Presidente Prudente, Albas et al. (2005) encontraram que 7,8% dos bovinos foram analisados como positivos para o RABV.

A maior positividade para a raiva encontrada em gado leiteiro poderia estar relacionada ao fato desses animais se encontrarem em uma condição de confinamento, o que leva a maior concentração de animais em um pequeno espaço, aumentando, deste modo, a disponibilidade de alimento para o morcego hematófago *Desmodus rotundus*. O tipo de criação local também influencia as raças mais afetadas, Oliveira et al. (2012) observaram uma maior positividade para raiva em raças taurinas (33,8%) em Minas Gerais e Langohr et al. (2003) observou maior frequência desta enfermidade em bovinos mestiços ou da raça nelore no Rio Grande do Sul.

A vacinação para a imunização contra raiva é um método eficaz para controle e prevenção de surtos da doença. Deste modo, é importante que a vacina utilizada esteja em boas condições de armazenamento sob refrigeração a temperatura entre +2 a +8°C, tanto anteriormente, quanto durante a utilização da mesma (CASTO; BRUNELL, 1991; BRIGGS et al., 2000).

A vacina utilizada é do tipo inativada e sua manutenção fora das condições adequadas de conservação pode levar a uma diminuição ou perda de sua eficácia. Uma queda na eficácia de proteção pela conservação inadequada da vacina justificaria o fato de que dentre os 39 bovinos positivos para raiva, 20 serem previamente imunizados contra o RABV. A resposta imune individual frente ao desafio vacinal também deve ser outro fator a ser considerado, uma vez que o animal pode ser um “mau respondedor” ao desafio antigênico, ou seja, mesmo com a vacina em boas condições de armazenamento e eficácia mantida, pode não ser capaz de atingir títulos protetores contra o RABV. Outro fator que também deve ser levado em consideração é a prática da vacinação somente após que propriedades vizinhas obtenham o diagnóstico positivo contra a raiva, como medida de controle do foco. Essa conduta pode não ser um método eficiente, uma vez que a raiva possui um período de incubação longo de 2 a 12 semanas (MAXIE, 2007). Além disso, existe a necessidade de intervalo de tempo de pelo menos 14 dias para que a elevação dos títulos de anticorpos neutralizantes tenha atividade protetora (BRIGGS et al., 2000).

A maioria dos animais acometidos (60%) no presente experimento eram jovens (com até 12 meses de idade), isso pode ser devido ao fato que a primovacinação em bovinos com menos de 5 meses de idade não deve garantir títulos protetores a esses animais, necessitando

assim, de doses de reforço para assegurar maior resposta humoral (YAKOBSON et al., 2015). Ribas et al. (2013), no Mato Grosso do Sul, observaram que 55% dos animais avaliados possuíam idade até 24 meses, assim como os resultados obtidos em diferentes regiões brasileiras, tais como: no nordeste do país (LIMA et al., 2005), no Mato Grosso do Sul (LANGOHR et al., 2003; LEMOS, 2005) e em Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2012).

Além disso, foi observado que há menor positividade em bezerros menores de um mês e em animais maiores de 48 meses. Provavelmente, isso deve ocorrer uma vez que os bezerros se encontram protegidos pela ingestão de colostro (BRAMBELL, 1958) e as sucessivas vacinações nos animais mais velhos induziriam proteção, uma vez que a vacina é uma boa indutora de imunidade (KOTAIT et al., 2010).

A maior positividade para raiva durante os meses de primavera (setembro a novembro) é um achado que não corrobora os demais trabalhos da literatura. Com exceção de Gomes e Monteiro (2011) que não observaram sazonalidade, diversos autores relatam um pico de positividade no período de outono/inverno (FEITAL; CONFALONIERI, 1998; SILVA et al., 2001; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2011; RIBAS et al., 2013; DOGNANI, 2014).

Os sinais clínicos predominantes observados nos bovinos acometidos com raiva neste trabalho foram incoordenação motora e movimentos de pedalagem, característicos da manifestação parálitica desta enfermidade (CENTOAMORE, 2017c), resultados semelhantes ao observado por diversos autores (LIMA et al., 2005; PEDROSO et al., 2009; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2011; RIBAS et al., 2013). Outra manifestação clínica frequente observada foi o decúbito.

Duas amostras não foram encaminhadas para o IVCC (1934-v/15 e 3469-v/15), pois se encontravam em avançado estado de autólise, fazendo com que as amostras sejam citotóxicas, tornando assim inviáveis o seu cultivo em células. Devido a isso, as suspensões foram inoculadas somente pela via intracerebral em camundongos, pois o sistema *in vivo* é mais resistente à citotoxicidade em relação ao *in vitro* e tiveram assim o resultado positivo, confirmando o resultado previamente obtido pela IFD (RUDD; TRIMARCHI, 1989).

O período de evolução da raiva é o intervalo de tempo de inspeção realizado pelo proprietário ou pelo tratador, o que a torna uma variável muito subjetiva, pois é dependente da experiência do observador, do tipo de criação animal (estabulada ou a pasto), do manejo e do momento da eutanásia nos bovinos estudados. Esses animais eutanasiados tiveram um período de evolução de 10 a 192 horas, podendo estar dentro do intervalo geralmente observado no curso natural da doença de 3 a 7 dias (PEDROSO et al., 2009).

A diferença no diagnóstico para raiva entre as técnicas de IVCC e IVC, obtidas nas amostras 1980-v/15, 2923-v/15 e 4159-v/15, poderia ser explicado em virtude da baixa carga viral, que seria consequência de eutanásias bovinas realizada precocemente (SMITH, 1995; TRIMARCHI; SMITH, 2002). Provavelmente, ocorreram nestes casos um período de evolução da doença mais curto, durante o qual não atingiu concentrações virais suficientes nas regiões encefálicas do SNC para serem detectadas pela técnica de IVCC. Ribas et al. (2013) e Carrieri et al. (2006) não encontraram relação entre eutanásia dos animais e menor positividade nas técnicas de IFD e IVC.

Além disso, outro fator que pode ter influenciado a discordância de diagnóstico entre as técnicas de IVCC e IVC é a perda de viabilidade viral durante a conservação da amostra ou da suspensão por período elevado de tempo, uma vez que o vírus é envelopado, este é sensível a alterações de temperatura. Em uma comparação realizada por Lopes et al. (2010), verificou-se uma perda importante de viabilidade viral em amostras de animais infectados com o RABV, após longos períodos de estocagem, havendo uma diminuição da positividade das mesmas no IVC.

CONCLUSÃO

No levantamento epidemiológico de casos de raiva em bovinos no estado de São Paulo, realizado no período de março de 2015 a março de 2016, observou-se que há distribuição geográfica por todo o estado com maior ocorrência na região de Bragança Paulista e áreas epidêmicas para a ocorrência de raiva em bovinos, sendo essas regiões que enviam mais amostras para diagnóstico para o IP/SP.

A maioria dos casos foi observada na estação da primavera (setembro a novembro), em bovinos jovens de até 12 meses e de raças de aptidão leiteira.

Agradecimentos

À FAPESP (Processo 15/17807-0) e CNPq(133132/2015-3) pelo apoio financeiro, ao Instituto Pasteur/SP e à FMVZ-USP pela estrutura cedida, aos funcionários e alunos de ambas as instituições por todo apoio e ajuda e à Coordenadoria de Defesa Agropecuária/SP na pessoa do Paulo Fadil, por fornecer os dados de abrigos de morcegos e os dados totais de bovinos positivos do estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, S.M.; FERNANDES, E.R.; CARRIERI, M.L.; CASTRO, A.B.M.; BATISTA, M.B.; 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. **Pesq. Vet. Bras.**,v.30, n.3, p.211-218, mar 2010.
- ALBAS, A.; ZOCCOLARO, P.T.; ROSA, T.Z.; CUNHA, E.M.S. Diagnóstico laboratorial da raiva na região oeste do Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**,v.38, n.6, p.493-495, nov-dez 2005.
- BRAMBELL, J.W.R. The passive immunityofyoungmammal.**Biol. Rev.**,v.33, p.488-531, 1958.
- BRASIL. Análise da situação epidemiológica da raiva no Brasil, no período de 2011 a 2016. **Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**. 2016a, *Online*. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/27/Informe-epidemiol--gico-raiva.pdf>>
- BRASIL. Casos de raiva humana, grandes regiões e unidades federadas 1990 a 2016. **Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**. 2016b,*Online*. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/07/raiva-humana-por-UF-1990-a-2016-12-2016.pdf>>
- BRASIL. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva**. Ministério da Saúde,Brasília, 2008. 110p.
- BRIGGS, D.J.; BANZHOFF, A.; NICOLAY, U.; SIRIKWIN, S.; DUMAVIBHAT, B.;TONGSWAS, S.; WASI, C. Antibody response ofpatientsafterpostexposure rabies vaccinationwithsmallintradermal doses ofpurifiedchickembryocellvaccineorpurified Vero cell rabies vaccine. **Bull. World Health Organ.**,v.78, n.5, p.693-698, 2000.
- CARRIERI, M.L.; PEIXOTO, Z.M.P.; PACIENCIA, M.L.B.; KOTAIT, I.; GERMANO, P.M.L. Laboratorydiagnosisofequine rabies and its implications for humanpostexposureprophylaxis. **J. Virol.Methods.**,v.138, p.1-9, ago 2006.
- CASTILHO, J.G.; IAMAMOTO, K.; LIMA, J.Y.O.; SCHEFFER, K.C.; CARNIELI JUNIOR, 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). **BEPA**,v.4, n.47, p.12-18, nov 2007.
- CASTO, D.T.; BRUNELL, P.A. Safe handlingofvaccines. **Pediatrics**,v.87, n.1, p.108-112, 1991.
- CENTOAMORE, N.H.F. Padrão de neuroinvasividade do vírus da raiva (RABV) no sistema nervoso central (SNC) de bovinos naturalmente infectados avaliados por diferentes técnicas diagnósticas. 2017c.
- DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H.**LaboratoryTechniques in Rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996.p.88-93.

DOGNANI, R. **Caracterização epidemiológica da raiva dos herbívoros no estado do Paraná entre 1977 e 2012**. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 11 de abril 2014.

FEITAL, A.S.S.; CONFALONIERI, U.E.C. Estudo epidemiológico da raiva bovina no Estado do Rio de Janeiro, Brasil (1980-1992). **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, v.5, n.1, p.21-27, 1998.

GALIZA, G.J.N.; SILVA, M.L.C.R.; DANTAS, A.F.M.; SIMÕES, S.V.D.; RIET-CORREA, F. Doenças do sistema nervoso de bovinos do semiárido nordestino. **Pesq. Vet. Bras.**, v.30, n.3, p.267-276, mar 2010.

GOMES, M.N.; MONTEIRO, A.M.V. Raiva bovina no estado de São Paulo e sua distribuição espacial entre 1992 e 2003. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 63(2):279-286, 2011.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **Virus taxonomy**: 2015. release. 2015. Online. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>

KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H., **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996, p.80-97.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M.L.; TAKAOKA, N.Y. **Raiva – Aspectos gerais e clínica**. Instituto Pasteur, São Paulo, 2009. 49p. (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. 58p. (Manuais, 9).

LANGOHR, I.M.; IRIGOYEN, L.F.; LEMOS, R.A.A.; BARROS, C.S.L. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. **Cienc. Rural.**, Santa Maria, v.33, n.1, p.125-131, jan-fev, 2003.

LEMOS, R.A.A. **Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões Centro-oeste e Sudeste do Brasil**. 149f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005.

LIMA, E.F.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, R.S.; GOMES, A.A.B.; LIMA, F.S. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.25, n.4, p.250-264, out-dez 2005.

LOPES, M.C.; VENDITTI, L.L.R.; QUEIROZ, L.H. Comparison between RT-PCR and the mouse inoculation test for detection of rabies virus in samples kept for long periods under different conditions. **J. Virol. Methods**. v.164, p.19-23, 2010.

LUZ, C.R. **Estudo cronológico sobre a raiva em Minas Gerais – no período de 1976 a 1986**. 122p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 29 de março de 1988.

MACHADO JÚNIOR, A.B. **Estudo epidemiológico da raiva em herbívoros domésticos no estado do Mato Grosso do Sul, 2003-2012.** 48p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 31 de março de 2014.

MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SALLIS, E.S.V.; GRECCO, F.B.; RAFFI, M.B.; SOARES, M.P.; SCHILD, A.L. Raiva em bovinos na Região Sul do Rio Grande do Sul: epidemiologia e diagnóstico imuno-histoquímico. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.31, n.4, p.331-335, abr 2011.

MAXIE, M.G. **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals.** 5th ed. Toronto: Saunders Elsevier, 2007. Vol. 1. p.413-416.

MENENQUETE, P.S. Diagnóstico situacional da raiva animal no estado do Rio de Janeiro. In: XXIII RITA. 2012, São Paulo. **Rev. Educ. Cont. Vet. Med. Zootec.**, v.10, n.2/3, p.64, 2012.

MENEZES, F.L.; SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; MENESES, J.N.C.; MAGALHÃES, D.F.; BARBOSA, A.D.; OLIVEIRA, C.S.F. Distribuição espaço-temporal da raiva bovina em Minas Gerais, 1998 a 2006. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.3, p.566-573, 2008.

OLIVEIRA, T.S.; BULL, V.; REZENDE, C.A.; FURTINI, R.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Perfil das amostras do sistema nervoso central de bovinos com síndrome neurológica e diagnóstico da raiva bovina no serviço de defesa sanitária de Minas Gerais, 2003-2010. **Pesq. Vet. Bras.**, v.32, n.4, p.333-339, abr 2012.

OPAS. **Termo de cooperação técnica (TCT).** Online. 2009. Disponível em: <http://ww3.panaftosa.org.br/tct_mapa/videosYT.aspx?video=p1>

PEDROSO, P.M.O.; COLODEL, E.M.; PESCADOR, C.A.; ARRUDA, L.P.; DRIEMEIER, D. Aspectos clínicos e patológicos em bovinos afetados por raiva com especial referência ao mapeamento do antígeno rábico por imuno-histoquímica. **Pesq. Vet. Bras.**, v.29, n.11, p.899-904, nov 2009.

PLOTKIN, S.A. Rabies. **Clin. Infec. Dis.**, v.30, n.1, p.4-12, 2000.

POZZETTI, P.S. **Estudo epidemiológico da raiva em animais herbívoros no Estado de São Paulo nos anos de 1996-1999.** 181p. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

QUEIROZ, L.H.; CARVALHO, C.; BUSO, D.S.; FERRARI, C.I.L.; PEDRO, W.A. Perfil epidemiológico na região Nordeste do Estado de São Paulo no período de 1993 a 2007. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.42, n.1, p.9-14, jan-fev 2009.

RIBAS, N.L.K.S.; CARVALHO, R.I.; SANTOS, A.C.; VALENÇOELA, R.A.; GOUVEIA, A.F.; CASTRO, M.B.; MORI, A.E.; LEMOS, R.A.A. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Mato Grosso do Sul: 1082 casos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.33, n.10, p.1183-1194, out 2013.

RUDD, R.J.; TRIMARCHI, C.V. Development and evaluation of *in vitro* virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.27, n.11, p.2522-2528, nov 1989.

RUPPRECHT, C.E. Rhabdoviruses: Rabies virus. In: BARON, S. **Medical microbiology**. Galveston: The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8618/>>

SCHNEIDER, L.G. Spread of the virus within the central nervous system. In: BAER, G.M. **The natural history of rabies**. Academic Press, 1975. p.199-216.

SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; HADDAD, J.P.A.; MODENA, C.M.; TUBALDINI, M.A.S. Distribuição temporal e espacial da raiva bovina em Minas Gerais, 1976 a 1997. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, n.3, p.263-272, 2001.

SMITH, J.S. Rabies virus. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R. **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for Microbiology Press, 1995. p.997-1003.

TRIMARCHI, C.V.; SMITH, J.S. Diagnostic evaluation. In: JACKSON, A.C.; WUNNER, W.H. **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002. p.308-350.

WEBSTER, W.A.; CASEY, G.A. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p.96-104.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO technical report series. 982 – **WHO expert consultation on rabies – Second report**. Geneva: World Health Organization, 2013.

YAKOBSON, B.; TAYLOR, N.; DVERES, N.; ROZENBLUT, S.; TOV, B.E.; MARKOS, M.; GALLON, N.; HOMER, D.; MAKI, J. Cattle rabies vaccination – A longitudinal study of rabies antibody titres in an Israeli dairy herd. **Prev. Vet. Med.**, v.121, p.170-175, 2015.

ANEXOS A

Figura 1 – Divisão do Estado de São Paulo em regionais e em área de risco epidemiológico da raiva dos herbívoros (Fonte: Kotait et al., 2010 – modificado).

Figura 2 – Encéfalo bovino recebido na Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo. **A)** Encéfalo antes do início do processamento, observa-se o aspecto sanguinolento da amostra. **B)** No lado direito da imagem se observa o tronco encefálico e tálamo separados do restante do encéfalo (lado esquerdo) (Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017).

Quadro 1 – Municípios dos estados de São Paulo e de Minas Gerais, divididos de acordo com o Escritório de Defesa Agropecuária (EDA), de origem das amostras de SNC de bovinos encaminhados para a Seção de Diagnóstico de Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo no período de março de 2015 a março de 2016.

EDA	Municípios de Origem	
Araçatuba	Araçatuba	1
	Brejo Alegre	1
	Subtotal	2
Araraquara	Descalvado	1
	Dourado	2
	Ribeirão Bonito	1
	São Carlos	1
	Subtotal	5
Botucatu	São Manuel	1
Bragança Paulista	Amparo	1
	Bom Jesus dos Perdões	1
	Joanópolis	6
	Pedra Bela	1
	Socorro	33
	Toledo/MG*	1
	Subtotal	43
Campinas	Itatiba	2
	Morungaba	2
	Paulínia	1
	Subtotal	5
Franca	Altinópolis	1
	Cristais Paulista	1
	Franca	5
	Itirapuã	4
	Patrocínio Paulista	5
	Pedregulho	3
	Restinga	3
	Subtotal	22
Itapeva	Barra do Chapéu	2
	Itararé	7
	Subtotal	9
Jaboticabal	Itápolis	1
Lins	Júlio Mesquita	1
Marília	Marília	1
Mogi das Cruzes	Salesópolis	2
Mogi-Mirim	Jaguariúna	1
	Itapira	4
	Mogi-Guaçu	1
	Subtotal	6
Orlândia	Ituverava	1
	Nuporanga	1
	Orlândia	1
	Subtotal	3
Ourinhos	Ourinhos	1
	São Pedro	3
	Subtotal	4
Piracicaba	Santa Bárbara d'Oeste	1
São João da Boa Vista	Arceburgo/MG*	1
	Divinolândia	1
	Espírito Santo do Pinhal	3
	Itobi	1
	Mococa	3
	Poços de Caldas/MG*	1
	São João da Boa Vista	3
	Subtotal	13
TOTAL		119

*Escritório de Defesa Agropecuária (EDA) mais próximo

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017

Quadro 2 – Resultado da imunofluorescência direta (IFD), de isolamento viral em cultivo celular (IVCC) e em camundongos (IVC) nas amostras de bovinos.

	IFD	ICC	IC		IFD	ICC	IC
1047-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	3148-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
1048-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	3199-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
1098-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	3200-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
1102-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	3281-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
1168-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	3304-v/15	Positivo	Positivo	Positivo
1171-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	3334-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
1172-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	3339-v/15	Positivo	Positivo	Positivo
1173-v/15	Negativo	Inconclusivo	Negativo	3462-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
1227-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	3469-v/15	Positivo	Impossibilitado	Positivo
1265-v/15	Positivo	Impossibilitado	Negativo	3472-v/15	Positivo	Positivo	Positivo
1298-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	3492-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
1299-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	3521-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
1310-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	3522-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
1315-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	3523-v/15	Positivo	Positivo	Positivo
1316-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	3583-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
1382-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	3585-v/15	Positivo	Positivo	Positivo
1397-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	3716-v/15	Positivo	Positivo	Positivo
1487-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	3814-v/15	Positivo	Positivo	Positivo
1492-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	3819-v/15	Positivo	Positivo	Positivo
1493-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	3854-v/15	Positivo	Positivo	Positivo
1504-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	3990-v/15	Positivo	Positivo	Positivo
1542-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	3992-v/15	Positivo	Positivo	Positivo
1717-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	3995-v/15	Negativo	Inconclusivo	Negativo
1718-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	4035-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
1772-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	4063-v/15	Positivo	Positivo	Positivo
1934-v/15	Positivo	Impossibilitado	Positivo	4064-v/15	Positivo	Positivo	Positivo
1946-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	4129-v/15	Impossibilitado	Impossibilitado	Negativo
1947-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	4154-v/15	Negativo	Inconclusivo	Negativo
1958-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	4155-v/15	Positivo	Positivo	Positivo
1980-v/15	Positivo	Negativo	Positivo	4159-v/15	Positivo	Negativo	Positivo
1991-v/15	Negativo	Impossibilitado	Negativo	4192-v/15	Positivo	Positivo	Positivo
2023-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	4218-v/15	Negativo	Impossibilitado	Negativo
2181-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	4387-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
2312-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	4513-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
2373-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	4574-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
2377-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	4697-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
2378-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	4764-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
2422-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	4802-v/15	Negativo	Negativo	Negativo
2516-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	102-v/16	Negativo	Negativo	Negativo
2548-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	152-v/16	Negativo	Negativo	Negativo
2554-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	159-v/16	Positivo	Positivo	Positivo
2555-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	207-v/16	Negativo	Negativo	Negativo
2556-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	232-v/16	Negativo	Negativo	Negativo
2575-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	234-v/16	Positivo	Positivo	Positivo
2601-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	284-v/16	Negativo	Negativo	Negativo
2602-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	366-v/16	Positivo	Positivo	Positivo
2606-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	413-v/16	Positivo	Positivo	Positivo
2607-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	421-v/16	Negativo	Negativo	Negativo
2746-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	506-v/16	Negativo	Negativo	Negativo
2753-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	509-v/16	Negativo	Negativo	Negativo
2794-v/15	Negativo	Inconclusivo	Negativo	525-v/16	Positivo	Positivo	Positivo
2882-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	573-v/16	Positivo	Positivo	Positivo
2891-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	634-v/16	Negativo	Negativo	Negativo
2923-v/15	Positivo	Negativo	Positivo	736-v/16	Negativo	Negativo	Negativo
2926-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	895-v/16	Negativo	Negativo	Negativo
3024-v/15	Negativo	Inconclusivo	Negativo	956-v/16	Negativo	Negativo	Negativo
3060-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	1056-v/16	Negativo	Negativo	Negativo
3107-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	1074-v/16	Negativo	Negativo	Negativo
3130-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	1081-v/16	Negativo	Negativo	Negativo
3143-v/15	Negativo	Negativo	Negativo				

Impossibilitado: amostra autolizada

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017.

Tabela 1 – Períodos de incubação e morbidade e taxa de mortalidade dos camundongos inoculados no isolamento viral em camundongos.

Animal	Período de incubação (dias)	Período de morbidade médio (dias)	Camundongos mortos/inoculados	Taxa de mortalidade
1168-v/15	6	2 ± 1	5/5	100%
1172-v/15	9	2 ± 1,23	5/5	100%
1310-v/15	9	2 ± 1,23	5/5	100%
1315-v/15	9	1,2 ± 0,45	5/5	100%
1316-v/15	9	2 ± 1,73	5/5	100%
1382-v/15	9	1,4 ± 0,55	5/5	100%
1492-v/15	9	3,8 ± 0,84	5/5	100%
1717-v/15	8	1,6 ± 1,34	5/5	100%
1718-v/15	12	1,4 ± 0,55	5/5	100%
1934-v/15	13	1,4 ± 0,55	5/5	100%
1980-v/15	12	1 ± 0	5/5	100%
2373-v/15	11	3,2 ± 0,84	5/5	100%
2377-v/15	11	1,8 ± 1,1	5/5	100%
2556-v/15	14	1,4 ± 0,89	5/5	100%
2753-v/15	9	1,8 ± 1,1	5/5	100%
2923-v/15	13	1,6 ± 0,55	6/6	100%
3304-v/15	12	1 ± 0	5/5	100%
3339-v/15	10	2 ± 1,41	5/5	100%
3469-v/15	10	1,6 ± 0,89	5/5	100%
3472-v/15	14	1	1/5	20%
3523-v/15	11	1 ± 0	5/5	100%
3585-v/15	8	2 ± 2,2	5/5	100%
3716-v/16	10	1,2 ± 0,45	5/5	100%
3814-v/15	14	1 ± 0	5/5	100%
3819-v/15	12	1,4 ± 0,55	5/5	100%
3854-v/15	14	1 ± 1	4/5	80%
3990-v/15	11	1,8 ± 1,1	5/5	100%
3992-v/15	13	1,2 ± 0,45	5/5	100%
4063-v/15	9	1 ± 0	4/5	80%
4064-v/15	7	1,2 ± 0,45	5/5	100%
4155-v/15	13	1 ± 0	5/5	100%
4159-v/15	16	1	1/10	10%
4192-v/15	9	1 ± 0	4/4	100%
159-v/16	9	1,8 ± 1,1	5/5	100%
234-v/16	9	2,2 ± 1,1	5/5	100%
366-v/16	11	1,6 ± 0,89	5/5	100%
413-v/16	7	2,6 ± 0,55	5/5	100%
525-v/16	8	1 ± 0	5/5	100%
573-v/16	8	2,2 ± 1,1	5/5	100%

*Isolamento viral em camundongos foi repetido

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017.

Gráfico 1 – Perfil racial dos bovinos com diagnóstico positivo para raiva. Resultados expressos em porcentagem. (Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017).

Avaliação do desempenho de diferentes técnicas laboratoriais realizadas para o diagnóstico da raiva em amostras de bovinos.

RESUMO

A raiva é causada por um vírus do gênero *Lyssavirus*, possui uma conformação que se assemelha a um projétil; fita-simples de RNA com senso negativo. Apesar dos esforços para seu controle, ainda é uma enfermidade que causa 70.000 óbitos humanos anualmente, sobretudo em países em desenvolvimento, sendo considerada como negligenciada. As técnicas consideradas “padrão ouro” para o diagnóstico *post-mortem* são a imunofluorescência direta (IFD) e o isolamento viral. Porém, como não são todos os laboratórios que possuem os insumos necessários para a realização destas técnicas, é importante que outros métodos laboratoriais para o diagnóstico da raiva sejam avaliados como técnicas alternativas e complementares. Para tal finalidade, as técnicas diagnósticas precisam ser específicas e sensíveis para garantir confiabilidade. Deste, modo, este estudo visou comparar diversos métodos diagnósticos para o vírus da raiva (IFD, imunohistoquímica - IHQ, isolamento viral em cultivo de células - IVCC, isolamento viral em camundongos - IVC, transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase - RT-PCR e RT-PCR em tempo real - RT-qPCR), quanto às suas sensibilidade e especificidade diagnósticas. Para isso, foram utilizadas amostras de sistema nervoso central provenientes de 127 bovinos encaminhados ao Instituto Pasteur de São Paulo. Os resultados observados indicam maiores sensibilidade e especificidade diagnósticas nas técnicas de IFD, IHQ e IVC (100%). Apesar das técnicas de RT-PCR e RT-qPCR possuírem resultados semelhantes, foram observadas amostras “inconclusivas”, mostrando, portanto, que há limitação quanto ao uso das mesmas com a finalidade de diagnóstico. O IVCC foi o método diagnóstico com menor valor de sensibilidade (91,9%), sendo assim, não recomendado seu uso exclusivo como método substitutivo à IFD. Frente aos resultados obtidos, conclui-se que todas as técnicas laboratoriais podem ser realizadas em conjunto, visando assim aumentar a capacidade laboratorial de confirmação.

Palavras-chave: Raiva bovina. Sensibilidade. Técnicas diagnósticas.

INTRODUÇÃO

O vírus da raiva (RABV) é um agente que causa uma encefalomielite aguda e de curso quase sempre letal causada por um vírus de RNA de fita simples e senso negativo do gênero *Lyssavirus* e da família *Rhabdoviridae* (KUZMIN; TORDO, 2012).

A raiva está presente em todos os continentes em mais de 150 países e territórios, com exceção da Antártida (BINGHAM; MERWE, 2002). Apesar de grandes campanhas para a erradicação da raiva canina, anualmente ainda ocorrem de 40.000 a 70.000 óbitos humanos no mundo, sobretudo em países em desenvolvimento (WHO, 2013). Estima-se que 99% dos casos ainda ocorrem pela transmissão através de agressão por cães, principalmente nos continentes africano e asiático. Mesmo em países desenvolvidos, nos quais a raiva canina foi erradicada, há a circulação do vírus em animais silvestres (RUPPRECHT; SLATE, 2012).

O diagnóstico consiste uma parte importante para se combater a raiva, já que o resultado influencia as decisões quanto ao tratamento profilático pós-exposição e as medidas tomadas em um controle de foco, deste modo, se faz necessário o uso de técnicas laboratoriais sensíveis e específicas para que o diagnóstico seja claro e inequívoco (MESLIN; KAPLAN, 1996; LÉCHENNE et al., 2016).

A negligência é representada pela falta de vigilância, o que leva à perda de dados sobre a incidência da enfermidade, estimativas de prejuízo econômico imprecisas e uma subestimativa da real importância mundial da raiva. A baixa vigilância é o resultado da falta de comprometimento político e de investimento para o controle da raiva, fazendo assim, com que a negligência se perpetue (LÉCHENNE et al., 2016).

Nenhum dos métodos laboratoriais apresenta 100% de sensibilidade e especificidade diagnósticas, porém quando realizados em conjunto aumentam a capacidade laboratorial de confirmação, embora o negativo não exclua a possibilidade de raiva, um diagnóstico positivo pode ser conclusivo (CALDAS; WADA, 2009). Um resultado falso negativo poderia resultar como consequência catastrófica uma morte humana.

A imunofluorescência direta (IFD) é considerada como teste “padrão ouro” pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) para o diagnóstico laboratorial *post-mortem* da raiva, uma vez que apresenta alta sensibilidade e especificidade, ambas são próximas a 100%, tanto para amostras animais, quanto humanas (DEAN et al., 1996; OIE, 2012). Além disso, por ser uma técnica rápida (3~4 horas para a sua execução) e acurada, é frequentemente utilizada como parâmetro para a continuidade ou não

da profilaxia pós-exposição em humanos que sofreram agravos por animais suspeitos (BOURGHY et al., 1989).

Apesar da sua eficiência comprovada, a IFD pode apresentar desvantagens que são capazes de dificultar seu uso, tais como: 1) alto custo na aquisição e manutenção do microscópio de fluorescência; 2) exposição a amostras que contenham o vírus vivo às pessoas que trabalham no laboratório; 3) necessidade de treinamento na leitura das lâminas coradas com fluorescência no microscópio; 4) necessidade do conjugado antirrábico de alta qualidade; 5) dificuldade do transporte de amostras frescas em condições adequadas para o diagnóstico (LAST et al., 1994; JOGAI et al., 2000; ARSLAN, et al., 2004; JACKSON; WUNNER, 2007; HOSSAIN, 2011). Adicionalmente, a amostragem de porções de sistema nervoso central (SNC) não representativas da distribuição viral também é um fator que pode contribuir na diminuição da eficiência dos resultados da IFD, principalmente nas situações de baixa carga viral, uma vez que o RABV não se distribui de forma homogênea pelo SNC e a disseminação viral difere entre as espécies animais, comprometendo a confiabilidade dos métodos laboratoriais para a detecção do vírus (STEIN et al., 2010; CENTOAMORE, 2017c).

Uma forma de reduzir o risco da exposição ao vírus vivo é a conservação das amostras de SNC em formol, uma vez que o RABV é rapidamente inativado neste fixador. Além da possibilidade de detecção do antígeno viral pela técnica de imunohistoquímica (IHQ), as amostras teciduais emblocadas em parafina fixadas em formol permitem preservar a estrutura do tecido e possibilitam a avaliação histológica para diagnósticos diferenciais de outras enfermidades que englobam as síndromes neurológicas em bovinos, uma vez que lesões teciduais podem ser observadas (LAST et al., 1994; RUPPRECHT et al., 2002). Esta fixação da amostra de SNC em formol apresenta também a vantagem de evitar a autólise do tecido nervoso, permitindo a sua conservação por períodos prolongados de tempo, podendo ser utilizado em estudos retrospectivos (ARSLAN et al., 2004).

Diversos estudos realizados para diagnóstico da raiva comparando a IFD à IHQ concluíram que ambas as técnicas possuem sensibilidades diagnósticas semelhantes (PALMER et al., 1985; ZIMMER et al., 1990; ACHKAR et al., 2010). Em diagnósticos de casos suspeitos de raiva com evolução nas fases iniciais, a IHQ pode ser até mais sensível do que as técnicas histológicas e a IFD. A desvantagem com relação à técnica é a dificuldade na aquisição de anticorpos antirrábicos comerciais policlonais universais. A maioria dos estudos realizados utilizou-se de anticorpos antirrábicos monoclonais e policlonais “caseiros”, que podem ter variação da sensibilidade em relação a variantes regionais do RABV, dificultando

assim o diagnóstico (PALMER et al., 1985; ZIMMER et al., 1990; ARSLAN et al., 2004; WOLDEHIWET, 2005; LEMBO et al., 2006).

Para os casos em que seja necessária a confirmação do resultado obtido no diagnóstico da raiva, o isolamento viral pode ser realizado, ou por inoculação intracerebral em camundongos ou em células de neuroblastomamurino N2A, conforme preconizado pela OMSe OIE (WHO, 2004; OIE, 2012).

O isolamento viral em camundongos (IVC) possui alta sensibilidade diagnóstica, próxima de 100% em amostras nas quais o vírus encontra-se viável, podendo detectar o RABV em amostras de SNC com baixa carga viral, sendo capazes em algumas situações particulares de resultar resultados positivos nos quais em outras técnicas apresentaram laudos negativos, como por exemplo, a IFD. Este sistema biológico apresenta também a vantagem de ser mais resistente à infecção bacteriana do que as de linhagens celulares, porém, o diagnóstico por IVC pode levar até 30 dias para ser obtido devido ao prolongado período de incubação das amostras de rua (BOURHY et al., 1989). Além de ser uma técnica mais onerosa e que necessita de mais espaço físico das instalações de infectório, há a exigência de um fornecimento ininterrupto de animais em bom status sanitário para o diagnóstico (MESLIN; KAPLAN, 1996; CHHABRA et al., 2007). No entanto, amostras de SNC em decomposição podem apresentar resultados negativos devido à inativação viral e consequente perda da sua viabilidade, mesmo sendo positivas para outras técnicas (ALBAS et al., 1999).

O isolamento viral em cultura de células (IVCC) possui vantagens quando comparado ao IVC, como custo reduzido, sendo aproximadamente três vezes menor (US\$ 17,00 por amostra) e maior rapidez na obtenção do resultado, que pode ser geralmente gerado em quatro dias (WEBSTER; CASEY, 1996; BONES et al., 2015). Castilho et al. (2007), em estudo realizado com amostras de SNC de morcegos, observaram que o IVCC é uma alternativa sensível, rápida e economicamente viável ao IVC. No entanto, esta técnica possui como principal desvantagem a necessidade além de instalações apropriadas para um cultivo de células, - tais como cabines de segurança biológica (para manutenção celular e inoculação viral) e estufas de CO₂ (para incubação) -, também de uma equipe técnica extremamente capacitada para a sua execução.

Além da importância diagnóstica do isolamento viral, estas técnicas (IVC e IVCC) também permitem a obtenção de estirpes virais, importante para a caracterização genética e fenotípica do “vírus de rua” em investigações posteriores, o que possibilitam tanto o estudo da epidemiologia molecular (CASTILHO et al., 2007) como o de patogênese viral (GAMON, 2015; KATZ et al., 2016).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional é um método complementar aos tradicionais como a IFD e isolamento viral, que pode ser utilizado na rotina laboratorial do diagnóstico da raiva, sendo considerado um procedimento sensível, específico e rápido. Além disso, esta técnica molecular possui eficiência comprovada na detecção viral inclusive em amostras autolisadas e emblocadas em parafina (SACRAMENTO et al., 1991; WACHARAPLUESADEE et al., 2006; FOOKS et al., 2009).

O gene-alvo do RNA genômico do RABV geralmente escolhido para o diagnóstico molecular é o codificador da nucleoproteína (N), considerado altamente conservado. Essa nucleoproteína possui funções associadas com a encapsidação do genoma viral e é utilizada para caracterização genética e antigênica das linhagens e variantes virais (SACRAMENTO et al., 1991; CARNIELI et al., 2006).

Apesar da alta sensibilidade, a detecção da amplificação do ácido nucléico viral exige uma etapa adicional de eletroforese em gel com a manipulação de amostras positivas, que se não for realizada de forma criteriosa pode aumentar o risco de contaminação cruzada. A utilização de sistema baseado em gel não permite a quantificação das cópias de genoma e há também a necessidade de sequenciar o produto de PCR encontrado com o objetivo de verificar a especificidade analítica, uma vez que bandas “espúrias” do mesmo tamanho em pares de bases do fragmento do amplicon desejado podem ser visualizadas e erroneamente classificadas como positivas (BELAK; THOREN, 2001; HUGHES et al., 2004). Esta técnica além de ser laboriosa e demorada, não apresenta alto rendimento, tornando assim inviável o processamento de um número elevado de amostras.

A PCR em tempo real (qPCR) permite a detecção em tempo real da amplificação do ácido nucléico viral de modo concomitante ao processo de polimerização por intermédio da identificação de um sinal de fluorescência. Atualmente emprega-se dois sistemas para a qPCR, sendo que um utiliza fluoróforos não específicos que se intercalam com a dupla-fita do DNA (ensaio Sybr Green I) e outro sistema é constituído por uma sonda de hidrólise Taqman composta por uma sequência específica de oligonucleotídeos marcados com “reporter” fluorescente (HARKESS; FOOKS, 2011; FISHER et al., 2012).

Hoffmann et al. (2009) verificaram a RT-qPCR como um sistema rápido, sensível, específico e confiável para o diagnóstico de enfermidades incluindo as lissavíroses, sendo inclusive mais sensível e específico que a RT-PCR convencional no ponto de vista analítico. Apesar da sensibilidade do sistema SYBR Green, há risco significativo de observação de resultados falsos positivos, quando executado sem o sequenciamento posterior das amostras amplificadas (WADHWA et al., 2017).

Porém as desvantagens da técnica de RT-qPCR são: o alto custo de equipamentos e reagentes (WONG; MEDRANO, 2005), além da diminuição da acurácia na análise de resultados em algumas situações que causam queda da eficiência na amplificação, tais como a presença da sequência alvo em baixas concentrações em relação aos ácidos nucleicos “não alvos” na amostra e a existência de inibidores que podem limitar a capacidade quantitativa deste método diagnóstico (POHL; SHIH, 2004; CANKAR et al., 2006; HINDSON et al., 2011; PEKIN et al., 2011; SANDERS et al., 2011).

Para que sejam executadas de forma a garantir a confiabilidade dos resultados obtidos, existe a necessidade de instalações laboratoriais sofisticadas e de pessoal treinado na execução das técnicas moleculares descritas. Além disso, com o intuito de melhorar a sua acurácia, se faz cada vez mais necessária, a disponibilidade comercial de kits padronizados e validados como ferramentas moleculares para o diagnóstico da raiva para a realização de forma eficiente do teste em amostras de rua.

Pela importância da raiva tanto na saúde pública quanto animal, é importante que se utilize técnicas que permitam um diagnóstico rápido e preciso, deste modo, esse trabalho avaliou as técnicas de IFD, IHQ, IVCC, IVC e moleculares com o objetivo de comparar sensibilidade e especificidade diagnósticas de cada método, visando verificar o desempenho destas técnicas em amostras de bovinos naturalmente infectados com RABV.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material

O estudo foi realizado com o SNC de 127 bovinos encaminhados para a Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo (IP/SP) por municípios dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Acre, no período de março de 2015 a março de 2016. As amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento do processamento das mesmas.

Métodos

Técnica de imunofluorescência direta

Foram confeccionadas lâminas com impressões de fragmentos de SNC, sendo que as mesmas foram submetidas à técnica de IFD para a pesquisa do antígeno viral, de acordo com a técnica descrita por Dean et al. (1996). A leitura foi realizada no microscópio de fluorescência LEICA DMBL.

Isolamento viral

O IVC foi realizado conforme metodologia descrita por Koprowski (1996), sendo que os camundongos pertencentes à linhagem Swiss-Webster de 21 dias de idade, com peso entre 12 e 14 gramas, foram inoculados pela via intracerebral com 0,03 mL de inóculo. Foram utilizados cinco animais por amostra e os mesmos foram observados diariamente durante 30 dias. A confirmação do diagnóstico foi obtida pela técnica de IFD. Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IP/SP (protocolo 04/15) e pela CEUA da FMVZ-USP (protocolo 7533040215).

O IVCC foi realizado com a utilização de células da linhagem de neuroblastomamurino 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 LEICA DML de fluorescência, com lâmpada HBO-50, com aumento de 200X.

Imunohistoquímica

Foram coletados fragmentos de SNC e os mesmos foram fixados em formol a 10% tamponado. Posteriormente, foram submetidos à desidratação em soluções alcoólicas, diafanização e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo a fim de produzir cortes de 5µm de espessura em lâminas de vidro silanizadas.

O antígeno viral foi detectado com a utilização do anticorpo primário antirrábico (Millipore 5199). A metodologia empregada foi descrita por Pedroso et al. (2008). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico Nikon Eclipse E2000.

Técnicas moleculares

Extração do RNA viral

A extração de RNA de aproximadamente 30mg de cada fragmento de SNC foi realizada utilizando-se o TRIzolReagent (Invitrogen® *Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA), seguindo o protocolo determinado pelo fabricante.

Transcrição reversa – síntese do DNA complementar

A transcrição reversa para DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir do RNA total utilizando-se o kit *SuperScript™III Reverse Transcriptase* (Invitrogen® *Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Neste protocolo foi adicionado ao RNA, 1µL de *primer* senso 21G (5'-

ATGTAACACCTCTACAATG-3') e 1 µL de *primer* antissenso 304 5'-TGACGAAGATCTTGCTCAT-3' na concentração de 0,5 µM, 1 µL de dNTP (mix de 10 mM – 2,5 mM de cada: dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e água ultrapura tratada com 0,1% de DEPC (diethylpyrocarbonate) q.s.p 14 µL. Esta mistura foi aquecida em 65°C por cinco minutos em termociclador (T Professional TRIO Thermocycler®-BiomtraProductLine) e depois mantida em gelo por, pelo menos, dois minutos. Em seguida, foram adicionados ao tubo de reação 4 µL de 5×*First-Strand Buffer*, 1 µL de ditioneitol 0,1 M (DTT) e 1 µL de *SuperScript™III RT* (200 U/µL). Os microtubos contendo as amostras foram colocados em termocicladora 50°C por 60 minutos para a extensão dos oligonucleotídeos iniciadores e, em seguida, a enzima foi inativada a 70°C por quinze minutos.

Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase para a amplificação do cDNA obtido através da transcrição reversa, utilizando-se o kit *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação do fragmento do gene codificador da proteína N de 248 pb de tamanho foi realizada em um termociclador (T Professional TRIO Thermocycler®-BiomtraProductLine) em uma reação com volume final de 50 µL, contendo 2,5 µL de cDNA, 1x tampão de PCR (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 9,0), 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer* senso 504 (5'-TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACT-3') e antissenso 304 (5'-TTGACGAAGATCTTGCTCAT-3'), 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 U de *Taq DNA polimerase platinum* e água ultra pura q.s.p. Os microtubos foram colocados em termociclador e submetidas nas seguintes condições de temperatura e tempo: 1) 94°C/1 min para denaturação inicial; 2) 5 ciclos (94°C/45 seg de denaturação, 55°C/45 seg de hibridização e 72°C/2 min de extensão); 3) um ciclo de extensão final de 72°C/10 min..

Reação em cadeia da polimerase em tempo real

A reação foi realizada a partir do cDNA obtido através da transcrição reversa utilizando-se o *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para a realização da RT-qPCR, foi utilizada placa de 96 orifícios *MicroAmp® Optical 96 well Reaction Plate* (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), e em cada orifício foram distribuídos 20 µL de *mix* contendo 12,5 µL de 2X *TaqMan® Universal PCR Master Mix*,

1,25µL do *CustomTaqman*[®] *Gene Expression Assay*20X, contendo os *primers* senso K1 (5'-GAGACAGCCCCCTTTGCA-3') e antissenso K2 (5'-GCCAGGAATCTGAAATTTGGTATGG-3') e a sonda de hidrólise KP (5'-FAM-ACGACCCACAAAATGT-MGB-3'), 2,5µL do 10X *ExoIPC Mix*, 0,5µL do 50X *ExoIPC DNA* e 3,25µL de água livre de nucleases, conforme descrito por Scheffer (2011).

As placas foram colocadas no termociclador StepOnePlusTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) submetidas as seguintes condições de temperatura e tempo: 1) 50°C/2 min para inativação da enzima UNG; 2) 95°C/10 min para a denaturação inicial; 3) 40 ciclos (95°C/15 seg de denaturação; 60°C/1 min de hibridização e extensão). Os resultados obtidos foram analisados pelo *StepOne Software* v2.2.2. Foram consideradas positivas pela RT-qPCR as amostras que apresentaram $C_q < 35$. Quando as amostras apresentaram o $C_q > 35$ ou $C_q < 40$ foram consideradas de resultado inconclusivo, sendo necessária a repetição das reações. Já quando as amostras apresentaram $C_q > 40$, foram consideradas negativas.

Cálculo de especificidade e sensibilidade

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

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

Para que o bovino 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 o diagnóstico *post-mortem* da raiva, o resultado foi considerado como discordante e na ausência de comprovação da especificidade por outra técnica foi classificado como falso positivo.

RESULTADOS

As sensibilidade e especificidade observadas para a técnica de IFD foram de 100%. Os demais métodos laboratoriais obtiveram resultados semelhantes, quando comparados à IFD, com exceção do IVCC com uma sensibilidade de 91,9% e da RT-qPCR com uma especificidade de 98,8% (tabela 1).

Tabela1 – Sensibilidade (S)e especificidade (E)diagnósticas das técnicas de isolamento viral em camundongo (IVC), isolamento viral em cultivo de células (IVCC),imunohistoquímica (IHQ), 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) comparadas à imunofluorescência direta (IFD).

			IHQ			IVC			IVCC			RT-PCR			RT-qPCR		
			P	N	Total	P	N	Total	P	N	Total	P	N	Total	P	N	Total
IFD	P	39	0	39	40	0	40	34	3	37	40	0	40	39	0	39	
	N	0	82	82	0	86	86	0	77	77	0	82	82	1	79	80	
	Total	39	82	121	40	86	126	34	80	114	40	82	122	40	79	119	
S (%)			100			100			91,9			100			100		
E (%)			100			100			100			100			98,8		

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017.

As técnicas que apresentaram maior concordância (100%) no diagnóstico para raiva entre si foram IFD, IVC e IHQ. Os métodos diagnósticos que apresentaram menor concordância entre os resultados obtidos foram: IVCC e RT-PCR (90,8% - 111/120), IVCC e RT-qPCR (88,3% - 106/120) e RT-PCR e RT-qPCR (87,4% - 111/127), como pode ser observado na tabela 2.

Tabela2 – Frequência de concordância entre as técnicas diagnósticas de imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em camundongo (IVC), isolamento viral em cultivo de células (IVCC), imunohistoquímica (IHQ), 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).

	Frequência	
IVC/IFD	126/126	100%
IHQ/IFD	121/121	100%
IHQ/IVC	121/121	100%
RT-PCR/IVC	122/127	96,1%
RT-PCR/IFD	121/126	96,0%
RT-PCR/IHQ	116/121	95,9%
IVCC/IHQ	114/121	94,2%
RT-qPCR/IFD	117/126	92,9%
RT-qPCR/IVC	118/127	92,9%
RT-qPCR/IHQ	112/121	92,6%
IVCC/IFD	111/120	92,5%
IVCC/IVC	111/120	92,5%
IVCC/RT-PCR	109/120	90,8%
IVCC/RT-qPCR	106/120	88,3%
RT-PCR/RT-qPCR	111/127	87,4%

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017.

Das 127 amostras de SNC de bovinos analisadas, 7,1% (9/127) foram consideradas impossibilitadas para a realização das técnicas diagnósticas por se encontrarem autolisadas [(três somente para o IVCC, duas para IHQ, três tanto para IVCC, quanto IHQ e uma para IFD, IVCC e IHQ) – anexo quadro 1]. Houve concordância entre todos os métodos diagnósticos na maioria dos casos [82,7% - (105/127)], em que todos os métodos diagnósticos para raiva utilizados obtiveram o mesmo resultado. Diferentemente, observou-se discordância nos resultados em apenas 17,3% (22/127) dos casos, observada nas técnicas de IVCC, RT-PCR e RT-qPCR (tabela3).

Tabela3 – Resultados observados para as técnicas de isolamento viral em camundongo (IVC), isolamento viral em cultivo de células (IVCC), imunofluorescência direta (IFD), imunohistoquímica (IHQ), 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).

Resultados		
Concordantes	105/127	82,7%
Discordantes	22/127	17,3%
IVCC	9/120	7,5%
RT-qPCR	9/127	7,1%
RT-PCR	5/127	3,9%
Impossibilitados	9/127	7,1%
IVCC	7/127	5,5%
IHQ	6/127	4,7%
IFD	1/127	0,8%

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017.

Foram observados resultados inconclusivos nas técnicas moleculares e no IVCC, sendo: cinco na RT-PCR (3,9% - 5/127), oito na RT-qPCR (6,3% - 8/127) e quatro no IVCC (3,3% - 4/120) (anexo – quadro 1).

DISCUSSÃO

As técnicas consideradas como “padrão ouro” para o diagnóstico da raiva são a IFD e o isolamento viral, desta forma os resultados obtidos nas demais técnicas foram a esses comparados.

Os métodos laboratoriais que obtiveram as maiores sensibilidade (100%) e especificidade (100%) diagnósticas foram IFD, IVC e IHQ. Além da sensibilidade e especificidades elevadas, a concordância entre essas técnicas também foi de 100%, resultados similares aos observados por diversos autores (GERMANO et al., 1977; MESLIN; KAPLAN, 1996; WOLDEHIWET, 2005; PEDROSO et al., 2008; TAO et al., 2008; ACHKAR et al., 2010). A partir da observação desses resultados, considerou-se a sensibilidade e especificidade como características intrínsecas às técnicas diagnósticas utilizadas para a detecção do RABV, deste modo não haveria melhor indicador da presença de raiva nas amostras de bovinos enviadas do que os resultados da IFD.

Castilho et al. (2007) descreveram a técnica de IVCC como eficiente para a detecção do RABV em amostras de bovinos, com uma concordância de 100% entre o IVCC, o IVC e a IFD. Diferentemente, Souza et al. (2015) observaram uma discordância de 40% entre as técnicas de IFD e IVCC, além da possibilidade de aumentar a sensibilidade do IVCC utilizando-se suspensões nas concentrações de 5% e 10% e amostras com concentrações

maiores que 20%, há possibilidade de citotoxicidade. As concordâncias observadas nesses trabalhos diferem da obtida neste trabalho, sendo esta de 92,9%, com este resultado observado não é recomendado o uso exclusivo do IVCC como alternativo à IFD, uma vez que esta última é capaz de identificar o RABV em 95-99% dos casos (OIE, 2012).

Na comparação entre IVC e IVCC, observou-se concordância entre as técnicas foi de 92,5%. Como os camundongos são mais sensíveis à infecção pelo RABV, essa divergência pode ser resultante de uma menor carga viral nas amostras de SNC de bovinos, uma vez que o IVCC possui um limite de detecção da raiva relativamente menor às demais técnicas diagnósticas utilizadas (KUZMIN, 2012). Esses resultados falsos negativos pela técnica de IVCC (amostras 1980-v/15, 2923-v/15 e 4159-v/15) poderiam ser explicados pela eutanásia precoce desses bovinos, e consequente menores cargas virais (SMITH, 1995; TRIMARCHI; SMITH, 2002; CENTOAMORE, 2017a). A eutanásia realizada de forma precoce não permite que o RABV se encontre em concentrações suficientes nas regiões encefálicas do SNC para que seja detectado pelo IVCC, porém não foi observada relação entre eutanásia e menor positividade nas técnicas de IFD e IVC, semelhante ao descrito por outros autores (CARRIERI et al., 2006; RIBAS et al., 2013).

Outro fator que deve interferir com os resultados de isolamento viral é a perda da viabilidade viral que pode ocorrer durante o período de conservação da amostra ou da suspensão, sobretudo por longos intervalos de tempo. Uma vez que, por possuir um envelope, o RABV é sensível a alterações de temperatura, podendo ocorrer inclusive diminuição da positividade no IVC como observado por LOPES et al. (2010).

As técnicas moleculares (RT-PCR e RT-qPCR) mostraram-se bastante sensíveis e específicas na detecção do RABV. Apesar disso, alguns resultados inconclusivos (2422-v/15, 2602-v/15, 3216-v/15, 3281-v/15 e 3334-v/15 na técnica de RT-PCR; e 1173-v/15, 1316-v/15, 1542-v/15, 2516-v/15, 2882-v/15, 2978-v/15, 634-v/16 e 736-v/16 na técnica de RT-qPCR) foram observados, indicando que o uso dessas técnicas no diagnóstico da raiva *post-mortem* deve ser realizado com critério.

As amostras consideradas inconclusivas necessitam, obrigatoriamente, de uma confirmação diagnóstica, por exemplo, o sequenciamento nucleotídico seguido da RT-PCR.

Uma vez confirmadas como negativas, a presença frequente de “banda espúrias” em amostras de SNC de bovinos poderia ser um indício que o primer apresenta hibridização inespecífica, sugerindo que a sua utilidade como método para o diagnóstico da raiva necessita de ajustes, como por exemplo, modificações na ciclagem (temperatura e tempo) ou mesmo remodelação no desenho dos primers oligonucleotídeos.

Se forem confirmadas como positivas pelo sequenciamento nucleotídico, este fato pode ser em decorrência de uma baixa carga viral, abaixo do limiar de detecção das outras metodologias empregadas (IFD, IVC, IVCC e IHQ), uma vez que a RT-PCR geralmente possui uma sensibilidade analítica superior que a das outras técnicas (BELAK; THOREN, 2001; HUGHES et al., 2004).

Deubelbeisset al. (2014) consideraram a RT-qPCR como método diagnóstico rápido, eficiente e altamente sensível, podendo ser utilizado, assim como a RT-PCR como ferramentas auxiliares à detecção do RABV pela IFD. A União Europeia realizou um estudo com diversos laboratórios de referência, no qual a RT-qPCR demonstrou uma concordância de 91% entre as instituições participantes, superior aos índices observados para IFD e IVCC, 87% e 70%, respectivamente (ROBARDET et al., 2011).

No caso da amostra 4129-v/15, na qual somente as técnicas de IVC, RT-PCR e RT-qPCR foram realizadas por causa da deterioração tecidual do SNC, fica evidente a importância das técnicas moleculares como métodos auxiliares no diagnóstico da raiva, uma vez que a autólise da amostra pode reduzir a sensibilidade da técnica de IFD, e deste modo, as técnicas moleculares permitem a detecção do RABV por períodos de tempo mais longos (KAMOLVARIN et al., 1993; HEATON et al., 1997; ALBAS et al., 1999; BURD, 2010). Além de interferir na sensibilidade da IFD, a autólise causa a redução na sensibilidade da IVCC, uma vez que esta pode ser considerada tóxica para o crescimento celular (RUDD; TRIMARCHI, 1989). No entanto, como observado por David et al. (2002), o resultado negativo na RT-PCR não exclui a possibilidade de raiva, uma vez que o RNA viral também pode estar deteriorado.

Além da isso, observou-se na RT-qPCR ocorrência de resultados inconclusivos em 5,5% das amostras (7/127), ou seja, naquelas com $C_q > 35$ (1173-v/15; 1542-v/15; 2516-v/15; 2882-v/15; 2978-v/15; 634-v/15 e 736). Nestas amostras, este alto C_q pode ser resultante de diversos fatores, tais como: 1) ligações não específicas; 2) degradação da sonda; 3) carga viral abaixo do limiar de detecção da técnica; 4) distribuição não uniforme do RABV na amostra de SNC (POHL; SHIH, 2004; CANKAR et al., 2006; STEIN et al., 2010; HINDSON et al., 2011; PEKIN et al., 2011; SANDERS et al., 2011).

A ocorrência de resultados inconsistentes para as técnicas moleculares em comparação as demais técnicas para o diagnóstico do RABV, como o falso positivo ocorrido para a amostra 1772-v/15, podem levar a inconvenientes, tais como a profilaxia pós-exposição desnecessária nos seres humanos envolvidos, eutanásia de animais de produção e ao controle improdutivo de morcegos hematófagos. Já com a ocorrência de resultados

falsosnegativos poderiaacarretarnasuspensão no protocolo de profilaxia pós-exposição e das medidasnecessáriasaocontrole de focos da doença, fato que exporiahumanos e animaisao vírus de forma desnecessária.

Na RT-qPCR osresultadosfalsosnegativosnadetecção do RABVpodemserdecorrentes de algunsfatores: 1) eutanásiaprecoce dos animais, de modo que emalgumasáreas do SNC a concentração do vírus poderiaserbaixa; 2)pequenas variações da sequência dos ácidos nucléicos nas amostras analisadas podendo acarretar em uma hibridizaçãoincompleta entre a sonda e o gene-alvo, afetando assim a sua detecção (DUPUIS et al., 2015).

CONCLUSÃO

Todas as técnicas laboratoriais para o diagnóstico da raiva utilizadas neste estudo demonstraram sensibilidade e especificidade diagnósticas superiores a 90%, deste modo, o uso dessas como ferramentas auxiliares à IFD podem ser de grande valia, uma vez que o diagnóstico não deve estar baseado exclusivamente no resultado obtido pela IFD, sendo necessária de pelo menos um método confirmatório. Portanto, todas as técnicas laboratoriais podem ser realizadas em conjunto, visando assim aumentar a capacidade laboratorial de confirmação.

Baseando-se nos resultados obtidos neste estudo, IFD, IHQ e IVC foram as técnicas laboratoriais mais sensíveis para a detecção do RABV. Em laboratórios que não possuem os insumos e equipamentos adequados à realização da IFD, a IHQ poderia ser considerada como método alternativo para o diagnóstico do RABV, ou ainda como confirmação dos resultados obtidospela IFD quando necessário.

A utilização de técnicas moleculares, tais como RT-PCR e RT-qPCR, para o diagnóstico *post-mortem* da raiva pode ser de grande valia, principalmente nas situações em que as amostras encontram-se em estágio de autólise avançado.

Agradecimentos

À FAPESP (Processo 15/17807-0) e CNPq (133132/2015-3) pelo apoio financeiro, ao Instituto Pasteur/SP e à FMVZ-USP pela estrutura cedida, aos funcionários e alunos de ambas as instituições por todo apoio e ajuda e à professora Mary S. Varaschin da Universidade Federal de Lavras por ceder gentilmente o anticorpo utilizado para a realização da IHQ.

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, S.M.; FERNANDES, E.R.; CARRIERI, M.L.; CASTRO, A.B.M.; BATISTA, M.B.; 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. **Pesq. Vet. Bras.**,v.30, n.3, p.211-218, mar 2010.
- ALBAS, A.; FERRARI, C.I.L.; DA SILVA, L.H.Q.; BERNARDI, F.; ITO, F.H. Influence of canine brain decomposition on laboratory diagnosis of rabies. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.32, n.1, p.19-22, 1999.
- ARSLAN, A.; SAGLAM, Y.S.; TEMUR, A. Detection of rabies viral antigens in non-autolyzed and autolyzed tissues by using na immuno-peroxidase technique. **Vet. Rec.**, v.155, p.550-552, 2004.
- BELAK, S.; THOREN, P. Molecular diagnosis of animal disease: some experiences over the past decade. **Expert Rev. Mol. Diagn.**,v.1, p.434-443, nov 2001.
- BINGHAM, J.; MERWE, M. Distribution of rabies antigens in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. **J. Virol. Methods**.,v.101, p.85-94, mar 2002.
- BONES, V.C.; GAMEIRO, A.H.; CASTILHO, J.C.; MOLENTO, C.F.M. Comparative costs of the mouse inoculation test (MIT) and virus isolation in cell culture (VICC) for use in rabies diagnosis in Brazil.**ATLA**.,v.43, p.81-87, may 2015.
- BOURHY, H.; ROLLIN, P.E.; VINCENT, J.; SUREAU, P. Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. **J. Clin. Microbiol.**.,v.27, n.3, p.519-523, mar 1989.
- BURD, E.M. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.23, n.3, p.550-576, jul 2010.
- 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. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v.18, n.4, p.385-394, out-dez 2009.
- CANKAR, K.;ŠTEBIH, D.; DREO, T.; ŽEL, J.; GRUDEN, K. Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. **BMC Biotechnol.**,v.6, n.37, doi:10.1186/1472-6750-6-37, 2006.
- CARNIELI, P.JR.; BRANDÃO, P.E.; CARRIERI, M.L.; CASTILHO, J.G.; MACEDO, C.I.; MACHADO, L.M.; RANGEL, N.; DE CARVALHO, R.C.; DE CARVALHO, V.A.; MONTEBELLO, L.; WADA, M.A.; KOTAIT, I. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil.**Virus Res.**,v.120, p.113-120, sept 2006.

CARRIERI, M.L.; PEIXOTO, Z.M.P.; PACIENCIA, M.L.B.; KOTAIT, I.; GERMANO, P.M.L. Laboratory diagnosis of equine rabies and its implications for human post exposure prophylaxis. **J. Virol. Methods**, v.138, p.1-9, ago 2006.

CASTILHO, J.G.; IAMAMOTO, K.; LIMA, J.Y.O.; SCHEFFER, K.C.; CARNIELI JUNIOR, 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). **BEPA**, v.4, n.47, p.12-18, nov 2007.

CENTOAMORE, N.H.F. Aspectos clínicos e epidemiológicos da raiva bovina apresentados na casuística de diagnóstico laboratorial do Instituto Pasteur no período de março de 2015 a março de 2016. 2017a.

CENTOAMORE, N.H.F. Padrão de neuroinvasividade do vírus da raiva (RABV) no sistema nervoso central (SNC) de bovinos naturalmente infectados avaliados por diferentes técnicas diagnósticas. 2017c.

CHHABRA, M.; MITTAL, V.; JAISWAL, R.; MALIK, S.; GUPTA, M.; LAL, S. Development and evaluation of *in vitro* isolation of street rabies virus in mouse neuroblastoma cells as compared to conventional tests used for diagnosis of rabies. **Indian J. Med. Microbiol.**, v.25, n.3, p.263-266, jul 2007.

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

DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p.88-93.

DEUBELBEISS, A.; ZAHNO, M.-L.; ZANONI, M.; BRUEGGER, D.; ZANONI, R. Real-time RT-PCR for the detection of lyssavirus species. **J. Vet. Med.**, v.2014, p.1-12, 2014.

DUPUIS, M.; BRUNT, S.; APPLER, K.; DAVIS, A.; RUDD, R. Comparison of automated quantitative reverse transcription-PCR and direct fluorescent-antibody detection for routine rabies diagnosis in the United States. **J. Clin. Microbiol.**, v.53, n.9, p.2983-2989, sept 2015.

FISCHER, M.; HOFFMANN, B.; FREULING, C.M.; MÜLLER, T.; BEER, M. Perspectives on molecular detection methods of lyssaviruses. **Berl.Münch.Tierärztl.Wochenschr.**, v.125, n.5-6, p.264-271, 2012.

FOOKS, A.R.; JOHNSON, N.; FREULING, C.M.; WAKELEY, P.R.; BANYARD, A.C.; MCELHINNEY, L.M.; MARSTON, D.A.; DATSJERDI, A.; WRIGHT, E.; WEISS, R.A.; MÜLLER, T. Emerging Technologies for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21st century. **PLoS Negl. Trp. Dis.**, v.3, n.9, e530, sept 2009.

GAMON, T.H.M. **Estudo da etiopatogenia do vírus da raiva utilizando um modelo murinho de neuroinfecção**. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

GERMANO, P.M.L.; MIGUEL, O.; CHAMELET, E.L.B.; MORITA, L.T.M.S. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo**, v.14, n.1, p.133-141, 1997.

HARKESS, G.; FOOKS, A.R. Lyssaviruses: special emphasis on rabies virus and other members of the *Lyssavirus* genus. **Methods Mol. Biol.**, v.665, p.279-307, 2011.

HEATON, P.R.; JOHNSTONE, P.; MCELHINNEY, L. Heminested PCR assays for detection of six genotypes of rabies and rabies related viruses. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p.2762-2766, 1997.

HINDSON, B.J.; NESS, K.D.; MASQUELIER, D.A.; BELGRADER, P.; HEREDIA, N.J.; MAKAREWICZ, A.J.; BRIGHT, I.J.; LUCERO, M.Y.; HIDDESEN, A.L.; LEGLER, T.C.; KITANO, T.K.; HODEL, M.R.; PETERSEN, J.F.; WYATT, P.W.; STEENBLOCK, E.R.; SHAH, P.H.; BOUSSE, L.J.; TROUP, C.B.; MELLEN, J.C.; WITTMANN, D.K.; ERNDT, N.G.; CAULEY, T.H.; KOEHLER, R.T.; SO, A.P.; DUBE, S.; ROSE, K.A.; MONTESCLAROS, L.; WANG, S.; STUMBO, D.P.; HODGES, S.P.; ROMINE, S.; MILANOVICH, F.P.; WHITE, H.E.; REGAN, J.F.; KARLIN-NEUMANN, G.A.; HINDSON, C.M.; SAXONOV, S.; COLSTON, B.W. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. **Anal. Chem.**, v.83, p.8604-8610, 2011.

HOFFMANN, B.; BEER, M.; REID, S.M.; MERTENS, P.; OURA, C.A.; VAN RIJN, P.A.; SLOMKA, M.J.; BANKS, J.; BROWN, I.H.; ALEXANDER, D.J.; KING, D.P. A review of RT-PCR Technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organization for Animal Health. **Vet. Microbiol.**, v.139, p.1-23, oct 2009.

HOSSAIN, M.G. Rabies: diagnostic challenges and immunohistochemistry as an alternative candidate. **BDvetNET**, v.2, n.1, p.4-6, 2011.

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. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.299-306, jan 2004.

JACKSON, A.C.; WUNNER, W.H. Future Developments and challenges. In: JACKSON, A.C.; WUNNER, W.H. **Rabies**. 2nd. Academic Press, 2007. p.411-469.

JOGAI, S.; RADOTRA, B.D.; BENERJEE, A.K. Immunohistochemical study of human rabies. **Neuropathology**, v.20, n.3, p.197-203, sep 2000.

KAMOLVARIAN, N.; TIRAWATNPONG, T.; RATTANASIWAMOKE, R.; TIRAWATNPONG, S.; PANPANICH, T.; HEMACHUDA, T. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. **J. Infect. Dis.**, v.167, p.207-210, 1993.

KATZ, I.S.S.; FUOCO, N.L.; CHAVES, L.B.; RODRIGUES, A.C.; RIBEIRO, O.G.; SCHEFFER, K.C.; ASANO, K.M. Delayed progression of rabies transmitted by a vampire bat. **Arch. Virol.**, v.161, p.2561-2566, 2016.

KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996, p.80-97.

KUZMIN, I.V.; TORDO, N. Genus Lyssavirus In: DIETZGEN, R.D.; KUZMIN, I.V. **Rhabdoviruses: Molecular taxonomy, evolution, genomics, ecology, host-vector interactions, cytopathology and control**. London: Caister Academic Press, 2012, p.37-57.

LAST, R.D.; JARDINE, J.E.; SMIT, M.M.E.; VAN DER LUGT, J.J. Application of immunoperoxidase techniques to formalina-fixed brain tissue for the diagnosis of rabies in Southern Africa. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v.61, p.183-187, 1994.

LÉCHENNE, M.; NAÏSSENGAR, K.; LEPELLETIER, A.; ALFAROUKH, I.O.; BOURHY, H.; ZINSSTAG, J.; DACHEUX, L. Validation of a rapid rabies diagnostic tool for field surveillance in developing countries. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.10, n.10, e0005010, oct 2016.

LEMBO, T.; NIEZGODA, M.; VELASCO-VILLA, A.; CLEAVELAND, S.; ERNEST, E.; RUPPRECHT, C.E. Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test for rabies. **Emer. Infect. Dis.**, v.12, n.2, p.310-313, feb 2006.

LOPES, M.C.; VENDITTI, L.L.R.; QUEIROZ, L.H. Comparison between RT-PCR and the mouse inoculation test for detection of rabies virus in samples kept for long periods under different conditions. **J. Virol. Methods**, v.164, p.19-23, 2010.

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. **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996, p.9-27.

PALMER, D.G.; OSSENT, P.; SUTER, M.M.; FERRARI, E. Demonstration of rabies viral antigen in paraffin tissue sections: Comparison of the immunofluorescence technique with the unlabeled antibody enzyme method. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, n.1, p.283-286, 1985.

PEDROSO, P.M.O.; PESCADOR, C.A.; BANDARRA, P.M.; RAYMUNDO, D.L.; BORBA, M.R.; WOUTERS, F.; BEZERRA JÚNIOR, P.S.; DRIEMEIER, D. Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido de sistema nervoso central de bovinos fixada em formol e emblocadas em parafina. **Pesq. Vet. Bras.**, v.28, n.12, p.627-632, dez 2008.

PEKIN, D.; SKHIRI, Y.; BARET, J.C.; LE CORRE, D.; MAZUTIS, L.; SALEM, C.B.; MILLOT, F.; EL HARRAK, A.; HUTCHISON, J.B.; LARSON, J.W.; LINK, D.R.; LAURENT-PLUIG, P.; GRIFFITHS, A.D.; TALY, V. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. **Lab. Chip.**, v.11, n.13, p.2156-2166, jul 2011.

POHL, G.; SHIH, IeM. Principle and applications of digital PCR. **Expert. Rev. Mol. Diagn.**, v.4, n.1, p.41-47, jan 2004.

OIE.Rabies. In: **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, Paris, 2012, p. 2.1.13.

RIBAS, N.L.K.S.; CARVALHO, R.I.; SANTOS, A.C.; VALENÇOELA, R.A.; GOUVEIA, A.F.; CASTRO, M.B.; MORI, A.E.; LEMOS, R.A.A. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Mato Grosso do Sul: 1082 casos. **Pesq. Vet. Bras.**,v.33, n.10, p.1183-1194, out 2013.

ROBARDET, E.; PICARD-MEYER, E.; ANDRIEU, S.; SERVAT, A.; CLIQUET, F. International interlaboratory trials on rabies diagnosis: An overview of results and variation in reference diagnosis techniques (fluorescent antibody test, rabies tissue culture infection test, mouse inoculation test) and molecular biology techniques. **J. Virol. Methods.**,v.177, n.1, p.15-25, oct 2011.

RUDD, R.J.; TRIMARCHI, C.V. Development and evaluation of *in vitro* virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. **J. Clin. Microbiol.**,v.27, n.11, p.2522-2528, nov 1989.

RUPPRECHT, C.E.; HANLON, C.A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **Lancet Infect. Dis.**,v.2, n.6, p.327-343, jun 2002.

RUPPRECHT, C.E.; SLATE, D. Rabies prevention and control: Advances and challenges. In: DIETZGEN, R.D.; KUZMIN, I.V. **Rhabdoviruses: Molecular taxonomy, evolution, genomics, ecology, host-vector interactions, cytopathology and control**. London: Caister Academic Press, 2012.p.215-252.

SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO, N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. **Mol. Cell. Probes.**,v.5, p.229-240, 1991.

SCHEFFER, K.C. **Deteção do vírus da raiva em órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* (Leach, 1821) por meio de RT-PCR, Hemi-Nested RT-PCR e Real Time RT-PCR**. 145p. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SMITH, J.S. Rabies virus. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R. **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for Microbiology Press, 1995. p.997-1003.

SOUZA, T. C. P. ; RODRIGUES, A. C. ; FAHL, W. O. ; ASANO, K. M. ; SCHEFFER, K. C. ; ACHKAR, S. M. ; Mori, E. ; IAMAMOTO, K. . Evaluation of sample concentrations in the accuracy of the rabies virus isolation in N2A cell culture. In: The 26th annual Rabies in the Americas Conference, 2015, Fort Collins, Colorado, USA. **The 26th annual Rabies in the Americas Conference**, 2015.

STEIN, L.T.; RECH, R.R.; HARRISON, L.; BROWN, C.C. Immunohistochemical study of rabies within the central nervous system of domestic and wildlife species. **Vet. Pathol.**,v.47, n.4, p.630-636, jul 2010.

TAO, X.Y.; NIEZGODA, M.; DU, J.L.; LI, H.; WANG, X.G.; HUANG, Y.; JIAO, Y.; CAO, L.; TANG, Q.; LIANG, G.D. The primary application of direct rapid immunohistochemical

test to rabies diagnosis in China. **Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology**, v.22, n.3, p.168-170, 2008.

TRIMARCHI, C.V.; SMITH, J.S. Diagnostic evaluation. In: JACKSON, A.C.; WUNNER, W.H. **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002. p.308-350.

WACHARAPLUESADEE, S.; RUANGVEJVORACHAI, P; HEMACHUDHA, T.A simple method for detection of rabies viral sequence in 16-year old archival brain specimens with one-week fixation in formalin. **J. Virol. Methods**, v.134, n.1-2, p.267-271, 2006..

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.; LI, Y. A pan-*Lyssavirus* Taqman real-time RT-PCR assay for the detection of highly variable *Rabies virus* and other lyssaviruses. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.11, n.1, e0005258, jan 2017.

WEBSTER, W.A.; CASEY, G.A. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p.96-104.

WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. **Clin.Chim.Acta.**, v.351, p.49-63, jan 2005.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v.39, n.1, p.11p, jul 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.WHO technicalreport series. 931 – **WHO expert consultation on rabies – First report**. Geneva: World Health Organization, 2004. 121p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.WHO technical report series. 982 – **WHO expert consultation on rabies – Second report**. Geneva: World Health Organization, 2013.

ZIMMER, K.; WIEGAND, D.; MANZ, D.; FROST, J.W.; REINACHER, M.; FREESE, K. Evaluation of five diferente methods for routine diagnosis of rabies. **J. Vet. Med. B.**, v.37, p.392-400, 1990.

ANEXOS B

Quadro 1 – Resultados obtidos para as técnicas de imunofluorescência direta (IFD), imunohistoquímica (IHQ), isolamento viral em camundongo (IVC), isolamento viral em cultivo de células (IVCC), reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).

	IFD	IVCC	IVC	IHQ	RT-PCR	RT-q PCR
1047-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1048-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1098-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1102-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1168-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1171-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1172-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1173-v/15	Negativo	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo
1227-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1265-v/15	Negativo	Impossibilitado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1298-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1299-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1310-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1315-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1316-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Inconclusivo
1382-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1397-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1487-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1492-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1493-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1504-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1542-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo
1717-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1718-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1772-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo*
1934-v/15	Positivo	Impossibilitado	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1946-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1947-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1958-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1980-v/15	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1991-v/15	Negativo	Impossibilitado	Negativo	Impossibilitado	Negativo	Negativo
2023-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2181-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2312-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Impossibilitado	Negativo	Negativo
2373-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
2374-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2377-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
2378-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2422-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Negativo
2516-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo
2548-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2554-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2555-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2556-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
2575-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Cont.	IFD	IVCC	IVC	IHQ	RT-PCR	RT-q PCR
2601-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2602-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Negativo
2606-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2607-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2746-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2753-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
2794-v/15	Negativo	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2882-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo
2891-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2923-v/15	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
2926-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2978-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo
3024-v/15	Negativo	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3060-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3107-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3130-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3143-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3148-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3199-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3200-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3216-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Negativo
3217-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3218-v/15	Negativo	Imposibilitado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3281-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Negativo
3304-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3334-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Negativo
3339-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3462-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3469-v/15	Positivo	Imposibilitado	Positivo	Imposibilitado	Positivo	Positivo
3472-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3492-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3521-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3522-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3523-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3583-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3585-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3716-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3814-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3819-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3838-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3839-v/15	Negativo	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3854-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3990-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3992-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Cont.	IFD	IVCC	IVC	IHQ	RT-PCR	RT-q PCR
3995-v/15	Negativo	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4035-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4063-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
4064-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
4129-v/15	Impossibilitado	Impossibilitado	Negativo	Impossibilitado	Negativo	Negativo
4154-v/15	Negativo	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4155-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
4159-v/15	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
4192-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
4218-v/15	Negativo	Impossibilitado	Negativo	Impossibilitado	Negativo	Negativo
4387-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4513-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4574-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4595-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
4697-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4764-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4802-v/15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
102-v/16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
152-v/16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
159-v/16	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
207-v/16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
232-v/16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
234-v/16	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
284-v/16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
366-v/16	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
413-v/16	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
421-v/16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
506-v/16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
509-v/16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
525-v/16	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
573-v/16	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
634-v/16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo
736-v/16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo
895-v/16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
956-v/16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1056-v/16	Negativo	Negativo	Negativo	Impossibilitado	Negativo	Negativo
1074-v/16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1081-v/16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Impossibilitado: amostra autolisada; *: Fraco positivo

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017.

Padrão de neuroinvasividade do vírus da raiva (RABV) no sistema nervoso central (SNC) de bovinos naturalmente infectados avaliados por diferentes técnicas diagnósticas.

RESUMO

A raiva pode se manifestar de duas formas: furiosa, caracterizada principalmente por alterações comportamentais, e parálitica, mais comumente observada nos animais herbívoros, sendo mais frequentes o comprometimento motor. Como há grande variação dos sintomas apresentados, é necessária a confirmação laboratorial da suspeita clínica. Para que tal, o envio correto do material ao laboratório deve ser realizado, porém o RABV não afeta todas as estruturas do sistema nervoso central (SNC) da mesma forma, deste modo, a eleição da melhor estrutura a ser encaminhada é imprescindível. Há muitas divergências de quais seriam as melhores porções do SNC a se encaminhar ao laboratório para o diagnóstico da raiva. Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo avaliar a distribuição viral nas diferentes estruturas do SNC (córtex, cerebelo, hipocampo, tálamo, medula espinhal e tronco encefálico – bulbo, ponte e mesencéfalo) pela utilização das técnicas de imunofluorescência direta (IFD), imunohistoquímica (IHQ), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e RT-PCR em tempo real (RT-qPCR), a partir da avaliação de 40 bovinos positivos para raiva encaminhados ao Instituto Pasteur de São Paulo, totalizando 210 fragmentos analisados. Os resultados observados indicam que não há diferença entre as estruturas do SNC dos bovinos quanto a intensidade de marcação antigênica na técnica de IHQ. O mesmo não ocorre na IFD, uma vez que houve diferenças estatisticamente significativas entre o mesencéfalo e ponte ($p=0,0391$) e entre ponte e tálamo ($p=0,0161$). Já os resultados obtidos pelas técnicas moleculares indicam menor sensibilidade para a detecção do RNA viral no cerebelo e tálamo, o que indica que há limitações na utilização das mesmas. Frente aos resultados obtidos, em relação às técnicas que se utilizam da marcação antigênica (IFD e IHQ), os fragmentos não diferiram quanto à presença do antígeno viral. Já a confirmação da positividade pelas técnicas moleculares, deve ser obtida preferencialmente das estruturas que compõem o tronco encefálico (bulbo, ponte e mesencéfalo).

Palavras-chave: Raiva bovina. Distribuição viral. Intensidade de marcação antigênica.

INTRODUÇÃO

A raiva é uma zoonose de origem viral, de evolução aguda e quase sempre de curso letal. Apesar dos esforços mundiais de controle e erradicação da doença, ainda é responsável pelo óbito de 40.000 a 70.000 pessoas anualmente, principalmente nos continentes asiático e africano. É uma doença prevenível pelos métodos profiláticos pré- e pós-exposição, porém uma vez que os sinais clínicos começam a ser manifestados, as chances de cura são extremamente limitadas. O quadro clínico da enfermidade não apresenta sinais característicos, o que torna o diagnóstico somente com a observação dos mesmos, difícil (WHO, 2013).

O vírus da raiva [*Rabies lyssavirus*(RABV)]é um agente do gênero *Lyssavirus* pertencente à família *Rhabdoviridae* e ordem *Mononegavirales* (ICTV, 2015). É um vírus envelopado, de genoma composto por uma fita simples de RNA, senso negativo e cinco proteínas estruturais, sendo: glicoproteína (G), proteína matriz (M), nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) e RNA polimerase viral. Seu capsídeo possui uma organização que faz com que eles possuam forma semelhante a um projétil (RUPPRECHT, 1996; CONSALES; BOLZAN, 2007).

O RABV não infecta todas as estruturas do sistema nervoso central (SNC) de modo uniforme. Vários estudos com resultados discordantes discutem quais seriam os fragmentos mais indicados para a detecção de antígenos virais. Os fragmentos que contêm antígenos de RABV com maior frequência podem variar de acordo com a patogenicidade, tropismo da amostra viral em questão e de acordo com a espécie animal (ACHKAR et al., 2010).

Por muitos anos, a região encefálica considerada de preferência para a detecção da presença de corpúsculos de Negri foi a do hipocampo. Bingham e van der Merwe (2002) observaram nesta região elevada frequência de partículas de antígeno de tamanho médio e grande detectadas pelas colorações histológicas tradicionais.

Martell (1969) observou pela reação de imunofluorescência direta (IFD), nos casos de raiva parálitica em bovinos, uma distribuição antigênica para o RABV mais intensa na região de bulbo olfatório, tálamo e córtex. Além disso, estes autores relataram que o cerebelo apresentou distribuição antigênica irregular em pequena intensidade variando de fraco positivo a negativo.

Binghame van der Merwe (2002), por sua vez, indicaram que a região do SNC de predileção de maior intensidade antigênica do RABV seria o tronco encefálico, particularmente o tálamo. Outras partes do encéfalo, incluindo o hipocampo, cerebelo e cérebro, ocasionalmente, podem resultar em falsos negativos para o antígeno do RABV.

Segundo Achkar et al. (2010) em estudos de detecção de antígeno do RABV pelas técnicas de IFD e imunohistoquímica (IHQ) realizados em amostras de equinos e bovinos, foi mais intensa a distribuição antigênica nos fragmentos de cerebelo e tronco encefálico. Silva et al. (2010) também observaram maior número de testes positivos pela IFD no tronco encefálico, cerebelo e medula de bovinos com raiva. Stein et al. (2010), utilizando a técnica de IHQ, também observaram sinal de marcação mais intensa nos neurônios do tronco encefálico e medula cervical.

Em bovinos, a forma mais comum de transmissão da raiva ocorre pela espoliação do morcego hematófago *Desmodus rotundus*, caracterizada pela forma paralítica da doença, na qual pode-se observar ataxia e a debilidade progressiva dos membros (Riet-Correa et al., 2002). O período de incubação pode variar de 30 a 90 dias (KOTAIT et al. 1998). A duração da doença é de 2 a 5 dias, podendo chegar a 10 dias (ACHA; SZYFRES, 1996).

O quadro clínico observado em bovinos é caracterizado pelo comportamento de isolamento do restante do rebanho. Outros sinais podem estar presentes, como midríase, pelos arrepiados, sonolência, movimentos anormais das extremidades pélvicas, corrimento nasal. Pode ocorrer ainda a hipersensibilidade no local da mordedura do morcego hematófago, podendo levar o animal acometido a coçar a região até causar ulceração (RONDON et al., 1995).

Os sinais neurológicos aparecem com a evolução da doença, como incoordenações, andar cambaleante e muitos animais chegam a arrastar os membros pélvicos. Ocorre a parada dos movimentos ruminais e a dificuldade de deglutição, por causa disso, muitas pessoas confundem esses sinais com o “engasgo” e, ao tentar socorrer o animal acometido, podem acabar se infectando com o vírus da raiva. A morte ocorre por paralisia dos músculos envolvidos na respiração (BRASIL, 2009).

De acordo com Jubb e Huxtable (1993), a variabilidade dos sinais clínicos observados e a progressão dos mesmos poderiam ser determinados por alguns fatores, tais quais: 1) concentração do RABV no inóculo; 2) patogenicidade da cepa viral envolvida; 3) o quão próximo está o local de inoculação e o encéfalo; 4) o estado imune do animal agredido.

Como há discordância na literatura sobre quais os fragmentos de SNC seriam mais indicados para a finalidade de diagnóstico da raiva, o presente trabalho teve como objetivo verificar a distribuição e quantificação viral no SNC de bovinos (tronco encefálico, tálamo, cerebelo, córtex, hipocampo e medula) naturalmente infectados pelo RABV por diferentes técnicas laboratoriais de detecção antigênicas (IFD e IHQ) e moleculares (RT-PCR e RT-qPCR).

MATERIAIS E MÉTODOS

Material

O estudo foi realizado com o sistema nervoso central (SNC) de 40 bovinos naturalmente infectados com o RABV encaminhados para a Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo (IP/SP), no período de março de 2015 a março de 2016, provenientes de municípios dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Acre. As amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento do processamento das mesmas.

Foram separados fragmentos das diferentes porções do SNC (cerebelo, córtex, hipocampo, medula cervical, tálamo e tronco encefálico – bulbo, ponte e mesencéfalo), totalizando 210 fragmentos (tabela 1).

Tabela 1 – Frequência de envio das diferentes porções do sistema nervoso central dos bovinos com diagnóstico positivo para raiva.

Estruturas	Recebidas/Bovinos
Bulbo	17/40 (42,5%)
Cerebelo	31/40 (77,5%)
Córtex	40/40 (100%)
Hipocampo	38/40 (95%)
Medula Cervical	3/40 (7,5%)
Mesencéfalo	33/40 (82,5%)
Ponte	15/40 (37,5%)
Tálamo	35/40 (87,5%)

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017.

Métodos

Técnica de imunofluorescência direta

Foram confeccionadas lâminas com impressões de fragmentos de SNC, sendo que as mesmas foram submetidas à técnica de IFD para a pesquisa do antígeno viral, de acordo com a técnica descrita por Dean et al. (1996). A leitura foi realizada no microscópio de fluorescência LEICA DMBL.

Isolamento viral

O IVC foi realizado conforme metodologia descrita por Koprowski (1996), sendo que os camundongos pertencentes à linhagem Swiss-Webster de 21 dias de idade, com peso entre 12 e 14 gramas, foram inoculados pela via intracerebral com 0,03 mL de inoculo. Foram utilizados cinco animais por amostra e os mesmos foram observados diariamente durante 30 dias. A confirmação do diagnóstico foi obtida pela técnica de IFD. Todos os procedimentos

realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IP/SP (protocolo 04/15) e pela CEUA da FMVZ-USP (protocolo 7533040215).

O IVCC foi realizado com a utilização de células da 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 LEICA DML de fluorescência, com lâmpada HBO-50, com aumento de 200X.

Imunohistoquímica

Foram coletados fragmentos de SNC e os mesmos foram fixados em formol a 10% tamponado. Posteriormente, foram submetidos à desidratação em soluções alcoólicas, diafanização e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo a fim de produzir cortes de 5µm de espessura em lâminas de vidro silanizadas.

O antígeno viral foi detectado com a utilização do anticorpo primário antirrábico (Millipore 5199). A metodologia empregada foi descrita por Pedroso et al. (2008). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico Nikon Eclipse E2000.

A determinação das cinco classes que refletem a intensidade das reações de IFD e IHQ 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.

Técnicas moleculares

Extração do RNA viral

A extração de RNA de aproximadamente 30mg de cada fragmento de SNC foi realizada utilizando-se o TRizol Reagent (Invitrogen® *Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA), seguindo o protocolo determinado pelo fabricante.

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™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen® *Life*

Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Neste protocolo foi adicionado ao RNA, 1µL de *primer* senso 21G (5'-ATGTAACACCTCTACAATG-3') e 1µL de *primer* antissenso 304 5'-TGACGAAGATCTTGCTCAT-3' na concentração de 0,5µM, 1µL de dNTP (mix de 10mM – 2,5mM de cada: dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e água ultrapura tratada com 0,1% de DEPC (diethylpyrocarbonate) q.s.p 14µL. Esta mistura foi aquecida em 65°C por cinco minutos em termociclador (T Professional TRIO Thermocycler®-Biometra Product Line) e depois mantida em gelo por, pelo menos, dois minutos. Em seguida, foram adicionados ao tubo de reação 4µL de 5×*First-Strand Buffer*, 1 µL de ditiotreitol 0,1 M (DTT) e 1 µL de *Super Script™ III RT* (200 U/µL). Os microtubos contendo as amostras foram colocados em termociclador a 50°C por 60 minutos para a extensão dos oligonucleotídeos iniciadores e, em seguida, a enzima foi inativada a 70°C por quinze minutos.

Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase para a amplificação do cDNA obtido através da transcrição reversa, utilizando-se o kit *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen® *Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação do fragmento do gene codificador da proteína N de 248 pb de tamanho foi realizada em um termociclador (T Professional TRIO Thermocycler®-Biometra Product Line) em uma reação com volume final de 50µl, contendo 2,5µL de cDNA, 1x tampão de PCR (50mM KCl, 20mMTris-HCl, pH 9,0), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* senso 504 (5'-TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACT-3') e antissenso 304 (5'-TTGACGAAGATCTTGCTCAT-3'), 1,5mM de MgCl₂, 2,5U de *Taq DNA polimerase* platinum e água ultra pura q.s.p. Os microtubos foram colocados em termociclador e submetidas nas seguintes condições de temperatura e tempo: 1) 94°C/1 min para denaturação inicial; 2) 5 ciclos (94°C/45 seg de denaturação, 55°C/45 seg de hibridização e 72°C/2 min de extensão); 3) um ciclo de extensão final de 72°C/10 min..

Reação em cadeia da polimerase em tempo real

A reação foi realizada a partir do cDNA obtido através da transcrição reversa utilizando-se o *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems*Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para a realização da RT-qPCR, foi utilizada placa de 96 orifícios *Micro Amp® Optical 96 well Reaction Plate* (Applied Biosystems*Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA), e em cada orifício foram distribuídos

20µL de *mix* contendo 12,5µL de 2X *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix*, 1,25µL do *CustomTaqman*[®] *Gene Expression Assay*20X, contendo os *primers* senso K1 (5'-GAGACAGCCCCCTTTGCA-3') e antissenso K2 (5'-GCCAGGAATCTGAAATTTGGTATGG-3') e a sonda de hidrólise KP (5'-FAM-ACGACCCACAAAATGT-MGB-3'), 2,5µL do 10X *ExoIPC Mix*, 0,5µL do 50X *ExoIPC* DNA e 3,25µL de água livre de nucleases, conforme descrito por Scheffer (2011).

As placas foram colocadas no termociclador Step One Plus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems *Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA) submetidas as seguintes condições de temperatura e tempo: 1) 50°C/2 min para inativação da enzima UNG; 2) 95°C/10 min para a denaturação inicial; 3) 40 ciclos (95°C/15 seg de denaturação; 60°C/1 min de hibridização e extensão). Os resultados obtidos foram analisados pelo *Step One Software* v2.2.2. Foram consideradas positivas pela RT-qPCR as amostras que apresentaram $C_q < 35$. Quando as amostras apresentaram o $C_q > 35$ ou $C_q < 40$ foram consideradas de resultado inconclusivo, sendo necessária a repetição das reações. Já quando as amostras apresentaram $C_q > 40$, foram consideradas negativas.

Para fins comparativos, estabeleceu-se um sistema de classificação de C_q , assim sendo, 0 (-) $C_q > 40$; 1 (+) $30 < C_q < 35$; 2 (++) $20 < C_q < 30$; 3 (+++) $10 < C_q < 20$; e 4 (++++) $C_q < 10$.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPad Prism*[®] 5. Para a comparação entre as intensidades de marcação antigênica observadas para os diferentes fragmentos nas técnicas de IFD e IHQ, foi utilizado o *One-way ANOVA*, não paramétrico de Kruskal-Wallis, com a realização do pós-teste de Dunns. Já a comparação entre os resultados obtidos nas técnicas moleculares (RT-PCR e RT-qPCR), foi realizada pelo teste t para dados paramétricos.

Foi considerado o intervalo de confiança de 95% e significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Pela análise dos 215 fragmentos de SNC, observou-se que todos foram positivos para a presença do RABV nas diferentes técnicas diagnósticas, mas com variações de resultados.

Na verificação das amostras positivas para RABV, a técnica de IFD apresentou uma positividade em 99,5% (214/215) nos fragmentos analisados, sendo que somente na ponte do

bovino 4159-v/15 foi observado como negativo. Os fragmentos também foram analisados quanto à intensidade de fluorescência, sendo constatada a ocorrência de diferença significativa entre as estruturas mesencéfalo e ponte (valor de $p=0,0391$), e entre ponte e tálamo (valor $p=0,0161$) (anexo - quadro 1). Já na IHQ observou-se uma positividade de 100% (210/210) nos fragmentos analisados; no entanto, não houve diferença estatística significativa entre as intensidades de marcação antigênica (figura 1 e anexo - quadro 2).

Quanto às técnicas moleculares, todos os bovinos positivos para raiva apresentaram positividade na RT-PCR, enquanto que na RT-qPCR uma amostra foi inconclusiva (1316-v/15), sendo observada diferença entre os fragmentos. Na RT-PCR foi observada positividade de 84,9% (174/205) e negatividade de 15,1% (31/205) dos fragmentos analisados por essa técnica. Já na RT-qPCR foi constatado resultados positivos em 73,7% (152/205), negativos em 21% (53/205) e inconclusivos em 5,3% (11/205) nas diferentes estruturas de SNC analisadas (tabela 2 e anexo - quadros 3 e 4). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a RT-PCR e RT-qPCR.

Tabela 2 – Resultados obtidos nas técnicas de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para o diagnóstico da raiva para os fragmentos analisados.

	RT-PCR					RT-qPCR						
	P (%)		N (%)		Total	P (%)		N (%)		I (%)		Total
Bulbo	14	93,3	1	6,7	15	14	93,3	1	6,7	0	0	15
Cerebelo	23	79,3	6	20,7	29	19	65,5	10	34,5	0	0	29
Córtex	33	84,6	6	15,4	39	33	84,6	1	2,6	5	12,8	39
Hipocampo	32	86,5	5	13,5	37	29	78,4	7	18,9	1	2,7	37
Medula Cervical	3	100,0	0	0,0	3	3	100,0	0	0,0	0	0	3
Mesencéfalo	31	93,9	2	6,1	33	27	81,8	5	15,2	1	3,0	33
Ponte	13	100,0	0	0,0	13	11	84,6	1	7,7	1	7,7	13
Tálamo	25	71,4	10	28,6	35	14	40,0	18	51,4	3	8,6	35
TOTAL	175	85,4	30	14,6	205	151	73,7	43	21	11	5,4	205

P: positivo; N: negativo; I: inconclusivo

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017.

De acordo com os escores obtidos nas técnicas de IFD, IHQ e RT-qPCR para os fragmentos (bulbo, cerebelo, córtex, hipocampo, medula espinhal, mesencéfalo, ponte e tálamo), foi possível observar, que a RT-qPCR foi a que mais divergiu em comparação às demais, principalmente pela ocorrência de resultados inconclusivos e negativos, mais frequentes no cerebelo e no tálamo (figura 2).

Figura 1 – Demonstração da presença do antígeno do vírus da raiva (ponta de seta) na técnica de imunohistoquímica em sistema nervoso central de bovinos. **A)** Cerebelo; **B)** Hipocampo; e **C)** Hipocampo. Aumento de 200X. (**Fonte:** Centoamore, N.H.F., 2017).

Figura 2 – Frequência em porcentagem (%) das classes de concentração antigênica e viral dos fragmentos do sistema nervoso central dos bovinos positivos para raiva, pelas técnicas de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), imunofluorescência direta (IFD) e imunohistoquímica (IHQ). Inc: inconclusivo. (Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017).

Os sinais clínicos observados foram característicos da raiva parálitica. Os bovinos apresentaram com maior frequência os seguintes sintomas: incoordenação (20,5% - 26/127) e movimentos de pedalagem (18,9% - 24/127). Além desses, foram relatados ataxia, apatia, paralisia, paralisia dos membros pélvicos e sialorréia. Foi possível inferir as estruturas acometidas pela infecção rábica no SNC de acordo com os sinais clínicos demonstrados pelos

bovinos; deste modo, baseando nos critérios das manifestações clínicas apresentadas, a área que parece estar mais comprometida seria a medula espinhal (tabela 3).

Tabela3 – Sinais clínicos observados separados de acordo com a região do sistema nervoso central (modificado de Lima et al., 2005).

Sinais clínicos	(%)	
Cerebelo		
Ataxia	13	10,2
Dismetria	3	2,4
Opistótono	8	6,3
Tremores musculares	6	4,7
Cérebro		
Agressividade	4	3,1
Anorexia	1	0,8
Apatia	13	10,2
Apetite anômalo	8	6,3
Cegueira	3	2,4
Espasmos musculares	4	3,1
Fotofobia	4	3,1
Movimentos de pedalagem	24	18,9
Mudanças de atitude	9	7,1
Medula espinhal		
Decúbito	1	0,8
Incoordenação	26	20,5
Paralisia, mas alerta	13	10,2
Paralisia dos membros torácicos	10	7,9
Paralisia dos membros pélvicos	15	11,8
Priapismo	2	1,6
Tenesmo	5	3,9
Tetania	3	2,4
Tronco encefálico		
Ataxia	13	10,2
Dificuldade de deglutição	1	0,8
Nistagmo	6	4,7
Midríase	8	6,3
Paralisia mandibular	1	0,8
Sialorréia	19	15

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017.

DISCUSSÃO

A análise da distribuição e carga viral do RABV (antigênica e molecular) em diferentes estruturas do SNC de bovinos corrobora com o preconizado pelo Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no manual de “*Procedimentos para o diagnóstico das doenças de sistema nervoso central de bovinos*” (BARROS, 2003).

De acordo com os resultados obtidos para as técnicas de IFD e IHQ, observou-se que ambas possuem capacidade de detecção do antígeno viral equivalentes, com distribuição antigênica semelhante. Com exceção de amostra de SNC 4159-v/15, as demais se apresentaram positivas nas duas técnicas em todos os fragmentos analisados. As diferenças quanto à intensidade de marcação antigênica observada, principalmente em cerebelo e ponte, explicam-se pelos anticorpos policlonais utilizados nas diferentes técnicas serem direcionados a epítomos distintos.

Quando analisada somente a intensidade de marcação antigênica do RABV pela IHQ, não houve diferença estatística significativa entre os fragmentos, diferentemente dos resultados obtidos por Achkar et al. (2010) e Stein et al. (2010), que encontraram maior marcação antigênica em cerebelo e tronco encefálico, sendo que a sensibilidade menor observada nestes trabalhos foi obtida para o hipocampo. Já Pedroso et al. (2009) observaram maior intensidade nos fragmentos de ponte, bulbo, mesencéfalo e córtex parietal, e menor em hipocampo e medula.

As estruturas que apresentaram maior intensidade de fluorescência foram mesencéfalo e tálamo, resultado semelhante ao descrito por Martell et al. (1969) e Bingham e van der Merwe (2002), que observaram maior concentração de antígeno em tálamo, fato que tornaria o diagnóstico pela análise desta estrutura como mais fácil. Porém contrariamente ao observado por esses pesquisadores, não houve falsos negativos em hipocampo, cerebelo e córtex cerebral, sendo que o único falso negativo encontrado no presente estudo foi em ponte de um único bovino (4159-v/15). A propagação centrípeta progressiva do vírus até o SNC poderia explicar a maior distribuição do RABV no tronco encefálico (SWANEPOEL, 2004).

Com relação aos sinais clínicos observados, não se observou relação dos mesmos com a maior presença viral nos fragmentos, indicando que não há influência da localização da presença viral no SNC no quadro clínico, fato também relatado por Sugamata et al. (1992). Além disso, os sintomas são fornecidos pelo proprietário ou tratador, dependendo assim da experiência dos mesmos e do momento do início da observação do animal acometido pela enfermidade (RIBAS et al., 2013).

Assim como observado por Lima et al. (2005), os sinais clínicos foram os característicos à forma paralítica da raiva, comum aos herbívoros. Os sintomas foram, de forma mais acentuada, os compatíveis à medula espinhal e comprometimento variável do tronco encefálico. Os sinais clínicos não se relacionam à intensidade de marcação antigênica

ou concentração viral encontrados nas diferentes estruturas, mas sim, aos locais nos quais as lesões são mais pronunciadas. Provavelmente a manifestação de raiva parálitica poderia estar relacionada com uma intensa inflamação não supurativa na região do tronco encefálico (OLIVEIRA et al., 2012; SHUANGSHOTI et al., 2013).

As técnicas moleculares se mostraram menos sensíveis para a detecção do RNA viral do que a IFD e a IHQ. Tanto a RT-PCR, quanto a RT-qPCR apresentaram menor positividade para os fragmentos de cerebelo e tálamo, e uma maior eficiência de detecção de ácidos nucleicos virais nas estruturas do tronco encefálico (bulbo, ponte e mesencéfalo) (tabela 2).

A RT-qPCR apresentou maiores diferenças na frequência da distribuição do RNA do RABV quando comparadas com as concentrações antigênicas demonstradas pelas técnicas da IHQ e IFD, principalmente no cerebelo e tálamo. Mas este padrão de menor limiar de detecção pode ser explicado, primeiramente pelas diferenças inerentes às técnicas, uma vez que os métodos moleculares identificam a presença de ácido nucleico viral, enquanto que a IFD e a IHQ baseiam-se na detecção antigênica. Como a transcrição e replicação virais são processos naturalmente dinâmicos, a variação observada entre a intensidade da marcação antigênica e a concentração viral do RABV, poderiam estar relacionados com: 1) o grau de produção e degradação mRNA do vírus, o que não ocorre da mesma forma com os antígenos virais e/ou 2) fatores inerentes ao hospedeiro quanto ao controle da transcrição genômica do RABV (SHUANGSHOTI et al., 2013).

Shuangshoti et al. (2013) observaram uma distribuição uniforme do RNA viral nas diferentes estruturas do SNC em cães rábicos pela RT-qPCR, sendo que apenas o cerebelo apresentou um menor número de cópias do genoma viral quando comparado às demais porções, semelhante ao observado no presente estudo.

As diferenças de resultados entre RT-PCR e RT-qPCR, principalmente entre cerebelo e tálamo (tabela 2), são indícios de menor eficiência de amplificação viral nestes fragmentos de SNC. Maiores estudos deveriam ser realizados para inferir quais seriam os fatores inibitórios que causariam essa menor detecção viral, como por exemplo, a utilização de outras técnicas de extração de ácidos nucleicos.

A inibição de amplificação do RNA do RABV pode ser provocada por diversos fatores: 1) condições ideais de reação, como uso dos primers e sondas corretos, qualidade e concentração dos reagentes utilizados e tempo e temperatura das reações; 2) contaminantes, que podem ser inerente aos materiais utilizados nas reações, como externos a esses, como por exemplo, bactérias, poeira; 4) resíduos fenólicos (WILSON, 1997). Além desses fatores, devemos excluir que a própria composição orgânica e química das estruturas de SNC

utilizadas no presente estudo poderiam causar a inibição da reação de amplificação, principalmente quando considerados cerebelo e tálamo.

CONCLUSÃO

De modo geral, não foi observada diferenças na positividade nas estruturas de SNC de bovinos. No entanto, constatou-se diferenças na intensidade, na distribuição, na concentração viral e antigênica observadas pelas diferentes técnicas utilizadas. As diferenças entre os métodos diagnósticos ocorreram por causa de seus diferentes limiares de detecção.

Uma vez que o RABV não se distribui de modo homogêneo pelo SNC, é imprescindível que as amostras encaminhadas ao laboratório para o diagnóstico da raiva permitam a obtenção dos resultados de modo confiável. Deste modo, é indicado o envio do tronco encefálico, sobretudo se as técnicas moleculares são utilizadas como método complementar ao diagnóstico. Portanto, é importante que se utilize concomitantemente as diferentes técnicas, principalmente nas amostras com resultados duvidosos.

Agradecimentos

À FAPESP (Processo 15/17807-0) e CNPq (133132/2015-3) pelo apoio financeiro, ao Instituto Pasteur/SP e à FMVZ-USP pela estrutura cedida, aos funcionários e alunos de ambas as instituições por todo apoio e ajuda e à professora Mary S. Varaschin da Universidade Federal de Lavras por ceder gentilmente o anticorpo utilizado para a realização da IHQ.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Virosis. In: **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3ªed. Washington: OPS, 2003. p.351-383, vol. 2.
- ACHKAR, S.M.; FERNANDES, E.R.; CARRIERI, M.L.; CASTRO, A.B.M.; BATISTA, M.B.; 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. **Pesq. Vet. Bras.**, v.30, n.3, p.211-218, mar 2010.
- BARROS, C.S.L. Coleta do encéfalo de bovinos para exame laboratorial. **Manual Técnico - Procedimentos para o Diagnóstico das Doenças do Sistema Nervoso Central de Bovinos**. Brasília : MAPA/SDA/DDA, 2003. pp. 15-34.
- BINGHAM, J.; VAN DER MERWE, M. Distribution of rabies antigen infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. **J. Virol. Methods**, v.101, p.85-94, 2002.

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

CARRIERI, M.L.; PEIXOTO, Z.M.P.; PACIENCIA, M.L.B.; KOTAIT, I.; GERMANO, P.M.L. Laboratory diagnosis of equine rabies and its implications for human post exposure prophylaxis. **J. Virol. Methods**, v.138, p.1-9, ago 2006.

CASTILHO, J.G.; IAMAMOTO, K.; LIMA, J.Y.O.; SCHEFFER, K.C.; CARNIELI JUNIOR, 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). **BEPA**, v.4, n.47, p.12-18, nov 2007.

CONSALES, C.A.; BOLZAN, V.L. Rabies review: immunopathology, clinical aspects and treatment. **J. Venom. Anim. Toxins**, v.13, n.1, p.5-38, jan 2007.

DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p.88-93.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **Virus taxonomy**: 2015. release. 2015. Online. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>

JUBB, K.V.F.; HUXTABLE, C.R. The nervous system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4th ed. San Diego: Academic, 1993. V.1, p.267-439.

KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H., **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996, p.80-97.

KOTAIT, I.; GONÇALVES, C.A.; PERES, N.F.; SOUZA, M.C.A.M.; TARGUETA, M.C. Controle da raiva dos herbívoros. São Paulo: Instituto Pasteur, 1998. 15p. (Manuais, 1).

MARTELL, M.A. Estudio de inmunofluorescencia de diferentes segmentos de encéfalos de bovinos muertos de rabia paralytica o derriengue en forma natural e inoculados experimentalmente. **Tec. Pec. Mex.**, v.12, p.24-27, 1969.

OLIVEIRA, T.S.; BULL, V.; REZENDE, C.A.; FURTINI, R.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Perfil das amostras do sistema nervoso central de bovinos com síndrome neurológica e diagnóstico da raiva bovina no serviço de defesa sanitária de Minas Gerais, 2003-2010. **Pesq. Vet. Bras.**, v.32, n.4, p.333-339, abr 2012.

PEDROSO, P.M.O.; PESCADOR, C.A.; BANDARRA, P.M.; RAYMUNDO, D.L.; BORBA, M.R.; WOUTERS, F.; BEZERRA JÚNIOR, P.S.; DRIEMEIER, D. Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido de sistema nervoso central de bovinos fixada em formol e emblocadas em parafina. **Pesq. Vet. Bras.**, v.28, n.12, p.627-632, dez 2008.

RIBAS, N.L.K.S.; CARVALHO, R.I.; SANTOS, A.C.; VALENÇOELA, R.A.; GOUVEIA, A.F.; CASTRO, M.B.; MORI, A.E.; LEMOS, R.A.A. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Mato Grosso do Sul: 1082 casos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.33, n.10, p.1183-1194, out 2013.

RIET-CORREA, F.; RIET-CORREA, G.; SCHILD, A.L. Importância do exame clínico para o diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso em ruminantes e equídeos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.22, n.4, p.161-168, out-dez 2002.

RONDON, E.S.; BASTOS, P.V.; SILVA, D.A.; PICCININI, R.S. Estudo comparativo da sintomatologia clínica de bovinos suspeitos de raiva. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.17, n.6, p.253-256, 1995.

RUPPRECHT, C.E. Rhabdoviruses: Rabies virus. In: BARON, S. **Medical microbiology**. Galveston: The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8618/>>

SCHEFFER, K.C. **Deteção do vírus da raiva em órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* (Leach, 1821) por meio de RT-PCR, Hemi-Nested RT-PCR e Real Time RT-PCR**. 145p. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; HADDAD, J.P.A.; MODENA, C.M.; TUBALDINI, M.A.S. Distribuição temporal e espacial da raiva bovina em Minas Gerais, 1976 a 1997. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, n.3, p.263-272, 2001.

SHUANGSHOTI, S.; THEPA, N.; PHUKPATTARANONT, P.; JITMITTRAPHAP, 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 Vet. Res.**, v.14, p.9-31, 2013.

SUGAMATA, M.; MIYAZAWA, M.; MORI, S.; SPANGRUDE, G.J.; EWALT, L.C.; LODMELL, D.L. Paralysis of steet rabies virus-infected mice is dependent on T lymphocytes. **J. Virol.**, v.66, n.2, p.1252-1260, feb 1992.

SWANEPOEL, R. Rabies, In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. **Infections Diseases of Livestock**. 2nd ed. Cape Town: Oxford University Press, 2004. Vol.2, p.1123-1182.

VURAL, S.A.; ALCIGIR, G.; BERKIN, S. Immunohistochemical and histopathological studies of fixed rabies virus in goats. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v.68, p.83-89, 2001.

WEBSTER, W.A.; CASEY, G.A. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p.96-104.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO technical report series. 982 – **WHO expert consultation on rabies – Second report**. Geneva: World Health Organization, 2013.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.63, n.10, p.3741-3751, oct 1997.

ANEXOS C

Quadro 1 – Positividade e intensidade de fluorescência nos fragmentos de sistema nervoso central de bovinos analisados pela técnica de imunofluorescência direta (IFD).

	Bulbo	Cerebelo	Córtex	Hipocampo	Medula Cervical	Mesencéfalo	Ponte	Tálamo
1168-v/15	NT	NT	++	+++	NT	+	NT	+
1172-v/15	++	+	+	+	NT	NT	NT	++
1310-v/15	+++	++++	++++	+++	+	+++	+++	++++
1315-v/15	NT	NT	+++	NT	NT	NT	NT	NT
1316-v/15	NT	NT	+++	NT	NT	NT	NT	NT
1382-v/15	++	++	+++	++++	NT	++++	NT	++++
1492-v/15	NT	+	+++	++	NT	++	NT	++
1717-v/15	NT	NT	++	++	NT	++++	NT	+++
1718-v/15	++	+	++	++	NT	+++	+	+++
1934-v/15	+++	+++	+++	+++	NT	NT	NT	NT
1980-v/15	NT	++++	++++	++++	NT	+++	NT	+++
2373-v/15	++	++++	++++	+++	NT	NT	+	NT
2377-v/15	++++	++++	+++	+++	+++	++++	+	++++
2556-v/15	NT	+++	+++	++	NT	+++	NT	++
2753-v/15	+++	++++	+++	++++	NT	++++	+++	++++
2923-v/15	++	+	+	+	NT	++	+	++
3304-v/15	+++	++	++	++	NT	+++	+++	+++
3339-v/15	NT	+	+	++	NT	+++	NT	+++
3469-v/15	NT	++++	++++	++++	NT	NT	NT	NT
3472-v/15	+++	++	++	+++	++	++	+	++
3523-v/15	NT	++	+++	++++	NT	++++	NT	++++
3585-v/15	NT	++	++	+	NT	++	NT	+++
3716-v/15	NT	+++	+++	++++	NT	+++	NT	++++
3814-v/15	NT	+	+	++	NT	++	NT	+++
3819-v/15	NT	+++	++	++	NT	+++	NT	+++
3854-v/15	++	+	+	++	NT	+++	++	+++
3990-v/15	NT	NT	++	++	NT	+++	NT	+++
3992-v/15	NT	NT	++++	++++	NT	+++	NT	+++
4063-v/15	NT	++++	+++	++++	NT	+++	NT	++++
4064-v/15	NT	++++	+++	+++	NT	+++	++	+++
4155-v/15	NT	+++	++	+++	NT	++++	NT	+++
4159-v/15	+	+	+	+	NT	+	-	+
4192-v/15	NT	NT	+++	++	NT	+++	NT	+++
4595-v/15	+++	+++	+++	+++	NT	+++	++	+++
159-v/16	NT	NT	++++	++++	NT	++++	NT	++++
234-v/16	NT	NT	+	+++	NT	NT	NT	++
366-v/16	+++	+	++	++	NT	++	+	+++
413-v/16	NT	+++	+++	+++	NT	++	NT	+++
525-v/16	NT	++	+++	+	NT	+	NT	++
573-v/15	NT	NT	++	+++	NT	+++	NT	+++
Total de positivos	15/15	30/30	40/40	38/38	3/3	33/33	12/13	35/35

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

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017.

Quadro 2 – Positividade e intensidade de marcação antigênica nos fragmentos de sistema nervoso central de bovinos analisados pela técnica de imunohistoquímica (IHQ).

	Bulbo	Cerebelo	Córtex	Hipocampo	Medula Cervical	Mesencéfalo	Ponte	Tálamo
1168-v/15	NT	NT	++	+++	NT	+++	NT	+++
1172-v/15	+	++	+	+++	NT	NT	NT	++
1310-v/15	++++	++++	+++	+++	+	+++	++++	+++
1315-v/15	NT	NT	++	NT	NT	NT	NT	NT
1316-v/15	NT	NT	+++	NT	NT	NT	NT	NT
1382-v/15	+++	++	+++	++	NT	+++	NT	++
1492-v/15	NT	+++	+++	+++	NT	++++	NT	++++
1717-v/15	NT	NT	++	+++	NT	++++	NT	+++
1718-v/15	+++	+++	+++	+++	NT	++	++	++
1934-v/15	++	++++	++++	+++	NT	NT	NT	NT
1980-v/15	NT	++	+++	++	NT	+	NT	+++
2373-v/15	++	+++	++++	++++	NT	NT	+++	NT
2377-v/15	++	++	++	+	++	++	++	++
2556-v/15	NT	+++	++	+++	NT	+++	NT	+++
2753-v/15	+++	+	+	++	NT	++	++	+++
2923-v/15	++	+	+	+	NT	+	+	+
3304-v/15	++	++	++	++	NT	+++	++	+++
3339-v/15	NT	+	+	+	NT	+	NT	+++
3472-v/15	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++++
3523-v/15	NT	+++	+++	+++	NT	+++	NT	+++
3585-v/15	NT	+++	+	+++	NT	+++	NT	++
3716-v/15	NT	+++	++	+++	NT	+++	NT	+++
3814-v/15	NT	++	+++	+++	NT	+++	NT	+++
3819-v/15	NT	+++	++	++	NT	+	NT	+++
3854-v/15	+++	+++	++	+++	NT	++++	++	++++
3990-v/15	++	++	+++	++++	NT	++	+	++
3992-v/15	+++	+++	++	+++	NT	+++	++++	++++
4063-v/15	NT	+++	+++	+++	NT	+++	NT	+++
4064-v/15	NT	+++	+++	+++	NT	++++	++	++
4155-v/15	NT	+++	+++	+++	NT	++++	NT	+++
4159-v/15	+	+	+	+	NT	+	+	+
4192-v/15	NT	NT	++++	++++	NT	+++	NT	++++
4595-v/15	+++	+++	++	+	NT	++	+	++
159-v/16	NT	NT	++	++++	NT	+++	NT	+++
234-v/16	NT	NT	++	++	NT	NT	NT	+++
366-v/16	++	+++	++++	++++	NT	++++	++++	++++
413-v/16	NT	+++	++	+++	NT	+++	NT	++
525-v/16	NT	+++	++	+++	NT	++++	NT	+++
573-v/15	NT	NT	++	+++	NT	+++	NT	++++
Total de positivos	17/17	31/31	39/39	37/37	3/3	33/33	15/15	35/35

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

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017.

Quadro 3 – Resultados observados na técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) com os valores de Ciclo de quantificação (Cq) observados para cada fragmento de sistema nervoso central de bovinos.

	Cq							
	Bulbo	Cerebelo	Córtex	Hipocampo	Medula Cervical	Mesencéfalo	Ponte	Tálamo
1168-v/15	NT	NT	14,528	13,966	NT	17,34	NT	14,266
1172-v/15	28,713	Negativo	12,151	Negativo	NT	NT	NT	25,029
1310-v/15	12,272	Negativo	10,814	12,247	13,24	10,796	12,7	23,527
1315-v/15	NT	NT	13,819	NT	NT	NT	NT	NT
1316-v/15	NT	NT	38,11	NT	NT	NT	NT	NT
1382-v/15	16,03	13,18	10,906	11,575	NT	12,933	NT	Negativo
1492-v/15	NT	30,121	20,222	26,251	NT	26,653	NT	Negativo
1717-v/15	NT	NT	16,189	15,691	NT	19,007	NT	Negativo
1718-v/15	26,676	29,864	24,246	28,895	NT	6,813	14,743	25,053
1934-v/15	34,647	15,463	13,603	Negativo	NT	NT	NT	NT
1980-v/15	NT	12,265	31,553	30,796	NT	9,232	NT	26,962
2373-v/15	10,791	22,733	15,033	19,472	NT	NT	21,84	NT
2377-v/15	20,62	11,736	38,445	24,476	13,903	15,808	23,288	32,15
2556-v/15	NT	31,681	16,754	26,218	NT	37,745	NT	Negativo
2753-v/15	16,423	11,691	14,813	11,681	NT	12,563	13,601	38,53
2923-v/15	31,761	26,284	36,954	34,954	NT	29,222	35,471	Negativo
3304-v/15	24,189	17,972	12,318	13,391	NT	19,848	24,189	Negativo
3339-v/15	NT	29,847	30,233	25,523	NT	12,88	NT	11,361
3469-v/15	Pool - 23,467							
3472-v/15	Negativo	Negativo	27,863	31,742	29,088	Negativo	30,457	31,113
3523-v/15	NT	28,425	28,932	24,444	NT	22,736	NT	Negativo
3585-v/15	NT	Negativo	26,151	30,869	NT	Negativo	NT	38,133
3716-v/15	NT	Negativo	11,39	36,459	NT	Negativo	NT	Negativo
3814-v/15	NT	32,803	33,796	28,287	NT	19,892	NT	Negativo
3819-v/15	NT	20,008	14,52	11,666	NT	14,779	NT	19,813
3854-v/15	30,859	Negativo	27,442	19,422	NT	24,937	Negativo	32,264
3990-v/15	NT	NT	39,237	Negativo	NT	30,381	NT	Negativo
3992-v/15	NT	NT	27,832	26,512	NT	22,659	NT	Negativo
4063-v/15	NT	Negativo	13,39	Negativo	NT	Negativo	NT	24,412
4064-v/15	NT	27,484	26,535	11,802	NT	15,449	27,75	Negativo
4155-v/15	NT	27,19	25,266	19,971	NT	23,348	NT	18,287
4159-v/15	24,705	Negativo	36,764	Negativo	NT	Negativo	28,203	Negativo
4192-v/15	NT	NT	27,434	25,403	NT	27,348	NT	Negativo
4595-v/15	23,016	23,184	Negativo	20,474	NT	20,474	22,727	Negativo
159-v/16	NT	NT	27,702	21,446	NT	21,435	NT	Negativo
234-v/16	NT	NT	24,837	21,9	NT	NT	NT	Negativo
366-v/16	18,589	Negativo	11,807	Negativo	NT	19,187	11,091	Negativo
413-v/16	NT	12,83	25,481	17,633	NT	11,991	NT	23,596
525-v/16	NT	Negativo	18,998	Negativo	NT	23,821	NT	37,29
573-v/15	NT	NT	25,161	11,846	NT	10,584	NT	23,887
Total de positivos	13/14	23/29	28/39	31/37	3/3	30/33	12/13	23/35

NT: Ausente

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017.

Quadro 4 – Resultados obtidos na técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para o diagnóstico da raiva para os fragmentos analisados.

	Bulbo	Cerebelo	Córtex	Hipocampo	Medula Cervical	Mesencéfalo	Ponte	Tálamo
1168-v/15	NT	NT	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Positivo
1172-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NT	NT	NT	Positivo
1310-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1315-v/15	NT	NT	Positivo	NT	NT	NT	NT	NT
1316-v/15	NT	NT	Positivo	NT	NT	NT	NT	NT
1382-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Positivo
1492-v/15	NT	Positivo	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Positivo
1717-v/15	NT	NT	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Positivo
1718-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NT	Positivo	Positivo	Positivo
1934-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	NT	NT	NT	NT
1980-v/15	NT	Positivo	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Positivo
2373-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NT	NT	Positivo	NT
2377-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
2556-v/15	NT	Positivo	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Positivo
2753-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	NT	Positivo	Positivo	Negativo
2923-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	NT	Positivo	Positivo	Negativo
3304-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NT	Positivo	Positivo	Negativo
3339-v/15	NT	Positivo	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Positivo
3469-v/15	Pool - Positivo							
3472-v/15	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3523-v/15	NT	Positivo	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Negativo
3585-v/15	NT	Positivo	Positivo	Negativo	NT	Positivo	NT	Negativo
3716-v/15	NT	Negativo	Negativo	Positivo	NT	Positivo	NT	Positivo
3814-v/15	NT	Negativo	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Negativo
3819-v/15	NT	Positivo	Negativo	Positivo	NT	Negativo	NT	Negativo
3854-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NT	Positivo	Positivo	Positivo
3990-v/15	NT	NT	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Negativo
3992-v/15	NT	NT	Negativo	Negativo	NT	Positivo	NT	Positivo
4063-v/15	NT	Negativo	Negativo	Positivo	NT	Positivo	NT	Positivo
4064-v/15	NT	Positivo	Negativo	Positivo	NT	Positivo	Positivo	Positivo
4155-v/15	NT	Negativo	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Positivo
4159-v/15	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	NT	Negativo	Positivo	Negativo
4192-v/15	NT	NT	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Negativo
4595-v/15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NT	Positivo	Positivo	Positivo
159-v/16	NT	NT	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Positivo
234-v/16	NT	NT	Positivo	Positivo	NT	NT	NT	Positivo
366-v/16	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	NT	Positivo	Positivo	Positivo
413-v/16	NT	Positivo	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Positivo
525-v/16	NT	Positivo	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Positivo
573-v/15	NT	NT	Positivo	Positivo	NT	Positivo	NT	Positivo
Total de positivos	13/14	23/29	33/39	32/37	3/3	31/33	13/13	25/35

NT: Ausente

Fonte: Centoamore, N.H.F., 2017.

CONCLUSÕES GERAIS

Com relação aos dados obtidos no presente estudo, a raiva no estado de São Paulo, durante o período observado, foi possível concluir que a doença é mais comum em bovinos jovens, de aptidão leiteira e provenientes da região fronteira com o estado de Minas Gerais (região de Bragança Paulista).

Os bovinos apresentavam um quadro de raiva parálitica, comumente observado nos herbívoros, caracterizado por quadro de paralisia progressiva e ascendente com início do comprometimento dos membros pélvicos.

As técnicas diagnósticas para o RABV que se mostraram mais sensíveis e específicas foram a IFD, a IHQ e o IVC. Os demais métodos diagnósticos (IVCC, RT-PCR e RT-qPCR) apresentam fatores limitantes ao seu desempenho. Apesar disso, possuem grande valor como técnicas auxiliares ao diagnóstico laboratorial.

Na análise das estruturas do SNC dos bovinos naturalmente infectados com o RABV, a observação do antígeno viral se mostrou mais eficiente que a detecção do RNA viral. Houve diferenças na intensidade de fluorescência na IFD obtida entre os fragmentos, sendo que foi significativa entre mesencéfalo e ponte, e ponte e tálamo. Com relação às técnicas moleculares, tanto a RT-PCR, quanto a RT-qPCR, foram semelhantes no que diz respeito à identificação do material genético do RABV. Ambas obtiveram menor positividade nos fragmentos de cerebelo e tálamo.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Virosis. In: **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3ªed. Washington: OPS, 2003. p.351-383, vol. 2.
- BRASIL. **Controle da raiva dos herbívoros**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. 124p.
- BRASIL. Casos confirmados de raiva animal por UF no Brasil. **Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**. 2016, *Online*. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/24/Raiva-Geral-2016-ATUALIZADO-21-12-2016.pdf>
- CARINI, A. Sur une grande epizootie de rage. **Ann. Inst. Pasteur**.v.25, p.843-846, 1911.
- HURST, E.W.; PAWAN, J.L. Na outbreak of rabies in Trinidad without history of bites and with symptoms of acute ascending myelitis. **Lancet**, v.221, p.622-668, 1931.
- KOTAIT, I.; GONÇALVES, C.A.; PERES, N.F.; SOUZA, M.C.A.M.; TARGUETA, M.C. Controle da raiva dos herbívoros. São Paulo: Instituto Pasteur, 1998. 15p. (Manuais, 1).

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. São Paulo: Instituto Pasteur, 2010. 58p. (Manuais, 9).

QUEIROZ-LIMA, E. A transmissão da raiva dos herbívoros pelos morcegos hematophagos da família desmodontidae. **Rev. Dept. Nac. Prod. Animal**, v.1, p.165-173, 1934.

RONDON, E.S.; BASTOS, P.V.; SILVA, D.A.; PICCININI, R.S. Estudo comparativo da sintomatologia clínica de bovinos suspeitos de raiva. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.17, n.6, p.253-256, 1995.

SMITHCORS, J.F. The history of some current problems in animal disease. **Vet. Med.**, v.53, p.149-154, 1958.

STEELE, J.H. History of rabies. In:BAER, G.M. **The Natural History of rabies**. 1st ed. Nova Iorque: Academic Press, 1975. Vol I, p.1-29.

TORRES, S.; QUEIRÓZ LIMA, E. A raiva e sua transmissão por morcegos hematófagos infectados naturalmente. Revista do Departamento Nacional de Produção Animal. Publicação oficial do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1935, Ano II, p.1-55.