VALDSON DE ANGELIS ²CÔRTEZ

7

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA
RAIVA NATURAL EM CÃES.
ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS
DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA
E DE INOCULAÇÃO EM CAMUNDONGOS E
ENTRE OS ESPÉCIMENS DE
SALIVA, OCULARES, DE GLÂNDULAS
SALIVARES E DE ENCÉFALO

Tese apresentada ao
Departamento de Prática de Saúde Pública
da Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor
em Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Gil Vianna Pain

São Paulo
1980

BIBLIOTECA
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

21081/80
Doc.

Ficha Catalográfica

(Preparada pela Biblioteca do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo)

Côrtes, Valdson de Angelis.

Diagnóstico laboratorial da raiva natural em cães :
estudo comparativo entre as técnicas de imunofluo-
rescência direta e de inoculação em camundongos e
entre os espécimens de saliva, oculares, de glându-
las salivares e de encéfalo / Valdson de Angelis
Côrtes. -- São Paulo, 1980.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Saúde Pública da Uni-
versidade de São Paulo. Departamento de Prática de
Saúde Pública.

Área de concentração: Virologia.

Orientador: Gil Vianna Pain.

Unitermos: 1. Raiva canina 2. Diagnóstico labora-
torial, Métodos "ante-mortem" 3. Diagnóstico labo-
ratorial, Métodos "post-mortem" 4. Imunofluores-
cência direta 5. Inoculação em camundongos

USP/ICB-22/80

A
memória
de
meus
pais.

Ao

Prof.Dr. Gil Vianna Paim

pela colaboração prestada durante o
planejamento e elaboração deste traba
balho.

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Instituto Pasteur de São Paulo,
pelos recursos de laboratório cedidos para a realização do experimento.

A Bióloga Maria Cecilia Gibrail de Oliveira,
pela efetiva colaboração em todas as fases de desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas,
Moacyr Rossi Nilsson,
Fumio Honma Ito,
José de Angelis Côrtes,
Silvio Arrudas Vasconcellos,
pelas sugestões apresentadas.

A Bibliotecária Daisy Pires de Noronha,
da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de
São Paulo, pela valiosa colaboração prestada na
revisão das referências bibliográficas.

Í N D I C E

	pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
2.1. Cães.....	7
2.1.1. Espécimens.....	7
2.2. Camundongos.....	7
2.3. Diluente.....	7
2.4. Cloridrato de Pilocarpina.....	7
2.5. Cloridrato de Ketamina (Ketalar).....	8
2.6. Colheita e procedimentos.....	8
2.6.1. Saliva.....	8
2.6.2. Córnea.....	8
2.6.3. Humor aquoso.....	9
2.6.4. Glândulas salivares.....	9
2.6.5. Encéfalo.....	10
2.7. Técnicas.....	10
2.7.1. Reação de imunofluorescência direta.....	10
2.7.2. Inoculação intracerebral em camundongos.....	10
2.7.3. Análise estatística.....	11
3. RESULTADOS.....	12
4. DISCUSSÃO.....	18
5. CONCLUSÕES.....	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

R E S U M O.

R E S U M O.

Espécimens de saliva, oculares, de glândulas salivares e de encéfalo obtidos de 30 cães infectados naturalmente, foram examinados através das técnicas de IFD e de IIC e posteriormente comparados, com o objetivo de apreciar a sensibilidade de alternativas propostas para o diagnóstico da raiva.

Os resultados evidenciam a ocorrência de discrepâncias entre as técnicas de IFD e de IIC apenas quando aplicadas aos espécimens de saliva, oculares e de glândulas salivares parótidas, em 5 (16,66%), 9 (30%) e 11 (36,66%) casos respectivamente, mas sem revelar significância estatística.

As glândulas salivares submaxilares e o encéfalo foram os espécimens mais apropriados para o diagnóstico da raiva, tanto à IFD, como à IIC, tendo ambos apresentado uma taxa de 100% de positividade, significativamente maior do que a observada com o exame da córnea, do humor aquoso e das glândulas salivares parótidas.

A associação das duas técnicas para o diagnóstico da raiva, tornou o procedimento tão sensível quanto a combinação pareada dos diferentes espécimens, embora a eficiência de 100%, não tenha sido observada em todas as oportunidades, quando se considerou uma ou outra alternativa.

O tratamento da saliva pelas técnicas de IFD e de IIC associadas, foi comparável à combinação da saliva com a córnea por IFD, para demonstrar a infecção rábica em cães. Ambas as alternativas revelaram uma positividade de 100%, idêntica à observada com cada um dos espécimens de glândulas salivares submaxilares e de encéfalo, quando tratados por uma ou outra técnica isoladamente.

S U M M A R Y .

S U M M A R Y.

From saliva, ocular, salivary glands and encephalon specimens collected from 30 naturally infected dogs were examined by means of the direct immunofluorescence and mouse intracerebral inoculation techniques. The results of the paired samples were compared in order to appreciate the sensibility of various alternative proposals for rabies diagnosis.

The results revealed discrepancies between the direct immunofluorescence and mouse intracerebral inoculation techniques only for the saliva, ocular and parotid salivary glands specimens in 5 (16,66%), 9 (30%) and 11 (36,66%) cases respectively, without showing any evidence of statistical significance.

The specimens from submaxillary salivary glands and encephalon were most suitable for the rabies diagnosis in either the direct immunofluorescence or in mouse intracerebral inoculation techniques, both of them showing a rate of 100% positiveness significantly greather than that observed in cornea, aqueous humor and parotid salivary glands examinations.

The association of the two techniques for the rabies diagnosis made the procedure as appreciable as the conjugation of different specimens taken two by two, although a 100% efficiency has not been observed in all cases, regarding to the procedures considered.

The direct immunofluorescence and mouse intracerebral inoculation associated procedure for the saliva examination was comparable to combined of saliva and cornea by direct immunofluorescence in order to demonstrate a rabid infection in dogs.

Both of the alternative procedures revealed a 100% positiveness identical to that observed for the submaxillary salivary glands and encephalon specimens, when submitted independently to either one or other technique.

1. INTRODUÇÃO.

1. INTRODUÇÃO.

A raiva, no grupo das zoonoses virais, ocupa uma posição de destaque, face a sua evolução geralmente fatal em seres humanos e em animais ^{1, 2, 27}.

A inexistência de recursos terapêuticos para conter a evolução da doença, coloca o controle dos reservatórios animais em primeiro plano, quanto a prevenção da enfermidade na população humana ²⁰.

A importância da raiva para a saúde pública não reside apenas na sua prevalência na população humana, considerada relativamente baixa, mas, essencialmente, na característica de letalidade e nos transtornos psíquico - emocionais e sociais que determina aos indivíduos das comunidades onde a doença ocorre ^{1, 2}. Igualmente importantes, são os custos do tratamento preventivo e as horas/homem perdidas anualmente em intervenções muitas vezes desnecessárias ².

Embora não se disponha atualmente de informação completa sobre todos os reservatórios animais envolvidos na persistência do vírus na natureza, o cão doméstico, dentre os vários hospedeiros naturais deste vírus, tem sido o principal responsável pela manutenção da doença no ecossistema urbano, especialmente, na América Latina ^{1, 27, 65}.

Em relação ao diagnóstico da raiva, os diferentes métodos usualmente empregados, utilizam ordinariamente material obtido após a morte ³⁸ proveniente do sistema nervoso central e esporadicamente das glândulas salivares ^{7, 27, 30, 66}.

A ocorrência do vírus da raiva tem sido revelada tanto no sistema nervoso, como em outros tecidos e humores de animais domésticos e silvestres, em casos naturais e em infecção experimental ^{6, 38, 59, 60, 62}.

No cão, em espécimens não provenientes do sistema nervoso central, o vírus da raiva foi demonstrado nas glândulas salivares submaxilares 10, 26, 38, 50, 51, 62, 69, parótidas 3, 60, glândulas lacrimais 38, na córnea 31, 38, na saliva 17, 19, 70, no muco oral e faringeano, no esôfago, na bexiga, nas glândulas supra-renais, no fígado, no pulmão, no rim, no pâncreas, na pelvis renal, em medula óssea e no tecido linfóide de casos naturais 27, 60.

A infecciosidade da saliva de cães raivosos foi demonstrada muito antes da descoberta da etiologia da raiva, mediante a reprodução da doença em animais de espécies homólogas e heterólogas 7, 65. Mas, esse procedimento então disponível mostrava-se bastante irregular e inseguro para indicar a presença do vírus na secreção salivar 7, 27, 68.

Os inconvenientes para a utilização da saliva no diagnóstico da raiva foram sendo superados com o desenvolvimento das técnicas de uso em virologia, tornando-se atualmente possível tal procedimento 7, 17, 27, 68. Mesmo assim, esse espécimen tem sido raramente examinado com objetivo de diagnóstico e o isolamento do vírus dessa origem tem falhado algumas vezes 7, 18, 20, 68, 70.

A literatura registra alguns relatos sobre o isolamento e a identificação do vírus rábico da saliva de animais 3, 4, 17, 18, 19, 45, 46, 47, 70, e de humanos infectados 67, no entanto, as informações disponíveis atualmente não permitem estabelecer parâmetros seguros para a aplicação desse material na sistemática do diagnóstico da infecção, visando tanto a confirmação clínica, como a realização de inquéritos epidemiológicos 3, 44, 45.

Apesar de estar devidamente comprovada a eliminação do vírus através da saliva, antes do aparecimento dos primeiros sintomas da doença 18, 68, após a recuperação espontânea 44, 45, 46, durante a fase clínica 17, 19, 68 e de portadores assintomáticos 3, 4, 18, 23, 44, 45, 46, 70, tanto na infecção natural 3, 70, como na experimental 6, 18, cer

ta inconstância tem sido revelada na demonstração do vírus nesse espécimen 18, 27, 45, 46, 68, 70.

A ocorrência de raiva abortiva 4, 23, 45 e de casos esporádicos de raiva humana adquirida pela mordedura de cães assintomáticos 45, 70, veio enfatizar ainda mais a importância do exame da saliva para elucidar a infecção rábica 44, 45.

Ultimamente, com a aplicação da técnica de anticorpos fluorescentes 25, 26 e com a introdução do camundongo lactente 19, 42, 43, 48 e do cultivo celular 33, 35, como sistemas de estudo do vírus rábico, alguns procedimentos foram realizados, visando o diagnóstico "ante-mortem" da raiva 31, 32, 33, 56, 67, 70. Nesse contexto, a verificação direta ou indireta do vírus na saliva representa um instrumento valioso 32, 33, 67, 70, embora não seja ainda inteiramente satisfatório para afastar a possibilidade de infecção diante de um resultado negativo 32.

A córnea, dentre outros tecidos próximos ao sistema nervoso central, sofre a infecção antes de outros órgãos 56, 57. Por isso, esse espécimen tem sido considerado um bom indicador da difusão centrífuga do vírus no organismo infectado 38, 56, 57.

O conhecimento da distribuição do vírus em tecidos e secreções, além do sistema nervoso, tem suscitado o estudo de procedimentos diagnósticos que utilizam diferentes espécimens passíveis de obtenção e processamento pré-mortem 56.

Nesse sentido, o teste de córnea desenvolvido por SCHNEIDER⁵⁶ (1969) tem sido aplicado em diversas espécies animais 6, 13, 18, 31, 40, 49, 55, 72 e no homem 16, 49, tanto "in vivo" 6, 18, como no "post-mortem" 31, 38, 49. Nenhum estudo, entretanto, procurou determinar a eficiência dessa técnica em cães, na fase clínica da doença natural.

Dentre os vários métodos propostos em diversas investigações para o diagnóstico precoce da raiva ^{9, 14, 15, 24, 55, 63, 67}, o teste de córnea tem sido considerado como o mais apropriado para indicar a infecção "in vivo" ^{32, 55, 72}, embora a significância atribuída a esta técnica em camundongos ⁵⁶ em relação a excreção do vírus através da saliva, ainda não esteja completamente confirmada em outras espécies animais ^{55, 72}.

O humor aquoso, pelas facilidades de colheita e de manuseio, representa mais um espécimen alternativo para o diagnóstico da raiva ^{40, 49}. Este material tem sido usado algumas vezes com o objetivo de demonstrar, mediante as técnicas de anticorpos fluorescentes e de inoculação intracerebral em camundongos ^{40, 49}, o vírus rábico de bovinos infectados por amostras de vírus fixo ^{40, 49}, por vírus de rua ⁴⁰ e de cães infectados naturalmente ⁴⁹, embora a presença do vírus não tenha sido revelada nesse espécimen de todos os animais comprovadamente raivosos, através do exame do corno de Ammon ^{40, 49}.

No diagnóstico da raiva realizado a partir de espécimens obtidos após a morte, as glândulas salivares deveriam representar um papel importante como indicadoras da excreção do vírus através da saliva ^{27, 28, 30, 38, 51, 52}. No entanto, o seu uso traz alguns inconvenientes relacionados ao processamento laboratorial e à distribuição irregular do antígeno nas diferentes porções do tecido glandular ^{10, 26, 38} refletindo na ocorrência de resultados falso-negativos em algumas ocasiões ^{26, 54}.

A presença do vírus da raiva nas glândulas salivares submaxilares de animais tem sido frequentemente comprovada na infecção natural ^{26, 38, 51, 60, 62, 69} e na experimental ^{6, 68}. Mas esse evento nas glândulas salivares e no encéfalo simultaneamente não tem sido observado em todas as oportunidades ^{10, 26, 38, 62, 68, 69}, do mesmo modo que, nem todos os animais com glândulas salivares positivas excretaram o vírus pela saliva ^{38, 59, 68} e a excreção salivar não tem coincidido sempre com a infecção glandular ⁶⁸.

Para o diagnóstico da raiva são disponíveis atualmente, técnicas histológicas, imunológicas e biológicas 5, 7, 12, 21, 22, 25, 41, 71. Na prática corrente, a pesquisa de inclusões celulares por coloração direta ⁴¹, a imunofluorescência direta ^{25, 29, 38, 54} e a inoculação intracerebral em camundongos ^{30, 71}, combinadas simultaneamente ^{7, 11, 21, 22, 34, 39, 53}, tem uso mais generalizado, objetivando e liminar a possibilidade de erro ^{7, 12, 22}.

O isolamento do vírus, considerado como o procedimento mais apropriado para elucidar a presença ou a ausência da infecção, apresenta, contudo, o inconveniente de uma resposta demorada para a decisão sobre o tratamento ^{5, 7, 22}.

Portanto, o critério atualmente adotado, para a instituição do tratamento pós-exposição de seres humanos, baseia-se na demonstração de corpúsculos de Negri nos tecidos encefálicos de animais suspeitos de raiva, embora estas estruturas não possam ser demonstradas em todos os casos em que o isolamento do vírus ocorre ^{11, 34, 41}. Além disso, a presença de inclusões celulares no encéfalo, não significa necessariamente que tenha havido excreção do vírus através da saliva ^{26, 59}.

A técnica de anticorpos fluorescentes permite a realização de um diagnóstico rápido e tem revelado uma concordância mais perfeita com a inoculação intracerebral em camundongos ^{29, 32, 39}.

Uma alternativa tem sido sugerida atualmente, para aumentar a rapidez e a sensibilidade da prova biológica, mediante o emprego do camundongo lactente ^{8, 19, 42, 43, 48} e do cultivo celular ^{33, 35}, associados à imunofluorescência direta, aplicada a partir do primeiro dia da inoculação ^{8, 33, 35, 36}.

As numerosas investigações realizadas mediante a utilização das técnicas de imunofluorescência direta e de inoculação intracerebral em camundongos ^{10, 11, 37, 40, 49, 60,}

61, 62, 64, tem revelado grande variação entre os diferentes espécimens empregados, relativamente a demonstração do vírus da raiva ^{38, 49}. Este fato não tem permitido, portanto, estabelecer parâmetros de correlação, capazes de refletir em todas as oportunidades, a eliminação viral pela fonte de infecção, apesar da semelhança verificada entre essas técnicas ^{5, 38, 39, 54}.

Torna-se necessário então, o estudo da associação de técnicas e de diferentes espécimens, a fim de aumentar a segurança e a rapidez no resultado do exame de laboratório realizado em animais.

O presente experimento teve como objetivo, estudar comparativamente o diagnóstico da raiva pelo exame da saliva, dos espécimens oculares (de córnea e de humor aquoso), das glândulas salivares e do encéfalo, obtidos de cães infectados naturalmente, através da imunofluorescência direta e da inoculação intracerebral em camundongos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS.

2. MATERIAIS E MÉTODOS.

2.1. Cães.

Foram utilizados 30 cães de ambos os sexos, sem raça definida, idade entre 2 a 30 meses, na fase clínica da raiva natural, mantidos em observação no Serviço de Profilaxia da Raiva, do Instituto Pasteur de São Paulo.

2.1.1. Espécimens.

Foram obtidos de cada um dos animais, os espécimens de saliva, oculares (córnea e humor aquoso), de glândulas salivares parótidas e submaxilares e de encéfalo.

2.2. Camundongos.

Para o isolamento do vírus dos diversos espécimens, foram utilizados camundongos albinos suíços, da linhagem CH-3, Rockefeller, adultos jovens, com peso variando entre 12 a 15 gramas, distribuídos em grupos de 8 animais.

2.3. Diluyente.

Tanto para o preparo das suspensões tissulares de glândulas salivares e de encéfalo, como para o tratamento da saliva e do humor aquoso, utilizou-se água destilada contendo 2% de soro de equino normal, previamente inativado a 56°C, durante 30 minutos, adicionada de 3 miligramas por mililitro de cloridrato de lincomicina.

2.4. Cloridrato de Pilocarpina.

Para indução da secreção salivar foi empregada uma solução de cloridrato de pilocarpina a 1% (peso x volume), em água destilada.

2.5. Cloridrato de Ketamina (Ketalar).

Na contenção química, utilizou-se o anestésico geral a base de cloridrato de ketamina (Ketalar), na dose de 5 a 10 miligramas por quilo de peso vivo.

2.6. Colheita e procedimentos.

2.6.1. Saliva.

Cada animal devidamente contido, recebeu por via intramuscular, o estimulante da secreção salivar na dose de 0,2 a 0,6 miligramas por quilo de peso vivo. Quinze minutos após, colhia-se a amostra de saliva em uma placa de Petri esterilizada, utilizando-se às vezes, uma seringa para auxiliar a operação. A quantidade obtida foi fracionada em duas alíquotas, sendo uma pura para exame direto e outra tratada com igual volume de diluente para uso na prova biológica ⁷¹.

A partir da saliva pura, esfregaços foram preparados em dois campos de cada uma das oito lâminas de vidro próprias para microscopia fluorescente, contendo decalques de cérebro de camundongos normais previamente preparados. Após a adsorção da saliva ao tapete de cérebro, as impressões permaneceram à temperatura ambiente por 30 minutos para secagem e, posteriormente, foram fixadas em acetona a -20°C durante 4 horas, sendo então, retiradas da acetona e mantidas a esta mesma temperatura até o momento do exame.

2.6.2. Córnea.

As células de córnea foram obtidas na fase clínica da raiva, por meio de impressões tomadas em dois campos de cada uma de oito lâminas de

vidro, próprias para microscopia fluorescente, usando-se quatro para cada olho. Realizada a colheita, as impressões foram fixadas em acetona a -20°C durante 4 horas e posteriormente, mantidas em temperatura de congelamento igual à de fixação, enquanto aguardava-se a oportunidade do exame.

2.6.3. Humor aquoso.

Este material foi colhido logo após a morte de cada animal, por punção da câmara anterior de ambos os globos oculares e transferido imediatamente para um tubo de ensaio estéril. O volume obtido foi tratado com igual volume de diluente e conservado em condições de refrigeração por duas horas, sendo posteriormente, submetido à prova biológica.

2.6.4. Glândulas salivares.

As glândulas salivares parótidas foram colhidas por incisão da pele e do tecido conjuntivo subjacente da região auricular, no sentido infero-superior, contornando a base do pavilhão auricular e removendo o tecido conjuntivo de revestimento. Após a exposição, foram colocadas em placas de Petri esterilizadas e guardadas em condições de congelamento, a -20°C , enquanto aguardava-se o processamento.

As glândulas salivares submaxilares, foram colhidas de acordo com a técnica descrita por TIERKEL in KAPLAN & KOPROWSKI^{28, 66}.

Das glândulas salivares, foram retiradas de várias áreas, amostras pesando 2 gramas para processamento. Estas frações foram fragmentadas inicialmente com uma tesoura e maceradas com pistilo em gral estéril. Nesse estágio da extração viral, preparavam-se impressões em

dois campos de cada uma de oito lâminas de vidro próprias para microscopia fluorescente, as quais fixadas em acetona a -20°C por 4 horas, permaneciam à mesma temperatura de congelamento até a oportunidade do exame. A etapa seguinte consistiu da adição de areia estéril e prosseguimento da trituração do tecido. A suspensão a 20% (peso x volume), resultante da adição de diluente ao macerado final, foi centrifugada a 1500 rpm., durante 5 minutos e o sobrenadante conservado sob refrigeração para uso como inóculo na prova biológica.

2.6.5. Encéfalo.

O corno de Ammon de todos os animais, foi colhido e processado segundo as técnicas convencionais de diagnóstico da raiva^{28, 66}.

2.7. Técnicas.

2.7.1. Reação de imunofluorescência direta.

Com exceção do humor aquoso, todos os demais espécimens foram examinados através da técnica de imunofluorescência direta aplicada ao diagnóstico da raiva^{25, 26}.

2.7.2. Inoculação intracerebral em camundongos.

Para o isolamento do vírus da raiva, exceção feita às células de córnea, todos os materiais colhidos foram submetidos à prova de inoculação intracerebral em camundongos^{7, 30, 71}. A leitura desta prova foi realizada durante 21 dias e a natureza da infecção determinada através da aplicação da reação de imunofluorescência direta²⁵, aos cérebros dos camundongos que apresentaram sintomas indicativos da raiva¹⁹.

2.7.3. Análise estatística.

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo teste da binomial, para comparação de duas proporções, conforme SIEGEL⁵⁸, 1956. O nível de significância adotado, foi de 0,05.

3. RESULTADOS.

3. R E S U L T A D O S.

Os resultados obtidos estão expostos nas TABELAS 1 e 2, apresentadas a seguir.

Na TABELA 1, encontram-se os resultados do diagnóstico laboratorial realizado em cães com raiva natural, segundo a identificação do animal, natureza do material colhido e a técnica utilizada.

Os dados desta tabela, permitem verificar que das 30 amostras de saliva estudadas, 29 (96,66%) foram positivas à imunofluorescência direta, 26 (86,66%) à inoculação intracerebral em camundongos e 25 (83,33%) delas apresentaram resultados positivos a ambas as técnicas. Os 5 (16,66%) restantes, foram positivos apenas a um ou outro método.

O teste de córnea, revelou a infecção rábica em 24 (80%) dos 30 cães examinados e o exame do humor aquoso, em 25 (83,33%) destes. Houve simultaneidade de resultados positivos em 20 dos 30 casos (66,66%) e de negativos em apenas 1 (3,33%) deles. Os demais 9 (30%) pares de amostras oculares, foram positivos, ora em um, ora em outro teste.

A reação de imunofluorescência direta demonstrou o antígeno rábico nas glândulas salivares parótidas de 24 cães (80%), do total estudado e o isolamento do vírus desta origem foi obtido de 23 (76,66%) mediante a inoculação intracerebral em camundongos. As duas técnicas foram simultaneamente positivas em 18 amostras (60%) e negativas em 1 (3,33%) destas. Nos demais 11 casos (36,66%) essas glândulas foram positivas apenas por um ou outro método.

Ambas as técnicas, de imunofluorescência direta e de inoculação intracerebral em camundongos, foram invariavelmente positivas, tanto no exame das glândulas salivares submaxilares como no do encéfalo, em todos os casos (TABELA 1).

As diferenças observadas entre as duas técnicas aplicadas simultaneamente ao diagnóstico da raiva, a partir dos espécimens de saliva, oculares (córnea e humor aquoso) e de glândulas salivares parótidas não foram significativas à análise estatística realizada através da prova da binomial ao nível de rejeição adotado de 0,05.

A TABELA 2, mostra os resultados obtidos através da combinação de espécimens diferentes submetidos à mesma técnica.

Os dados desta tabela, mostram que a ocorrência do antígeno rábico foi demonstrada simultaneamente na saliva e na córnea de 23 (76,66%) casos e em um ou outro espécimen de 7 (23,33%) animais. Destes últimos, foram negativas 1 (3,33%) amostra de saliva e 6 (20%) de córnea (TABELA 2).

Ambos os espécimens de saliva e de humor aquoso de 22 cães (73,33%) foram positivos e de 1 (3,33%) negativos à inoculação intracerebral em camundongos. Nos outros 7 casos (23,33%), o isolamento do vírus foi observado alternadamente em um ou outro espécimen, sendo positivas 4 (13,33%) amostras de saliva e 3 (10%) de humor aquoso (TABELA 2).

O exame paralelo da saliva e das glândulas salivares parótidas por imunofluorescência, evidenciou completa identidade de resultados em relação a saliva e a córnea examinadas pela mesma técnica (TABELA 2).

A saliva e as glândulas salivares parótidas de 20 cães (66,66%) foram positivas e de 1 (3,33%) negativas à inoculação intracerebral em camundongos. Nos demais 9 casos (30%), ocorreu variação entre os dois espécimens, sendo positivas 6 (20%) amostras de saliva e 3 (10%) de glândulas salivares (TABELA 2).

Os resultados obtidos ao exame da saliva 29/30 (96,66%) e das glândulas salivares submaxilares 30/30

(100%) por imunofluorescência direta, correspondem exatamente aos observados entre a saliva 29/30 (96,66%) e o encéfalo 30/30 (100%) à mesma técnica (TABELA 2).

A relação saliva 26/30 (86,66%)/glândulas salivares submaxilares 30/30 (100%) manteve igual proporção quando comparada com a saliva 26/30 (86,66%) e o encéfalo 30/30 (100%) por inoculação intracerebral em camundongos (TABELA 2).

Dentre os 30 cães estudados, 20 (66,66%) continham o vírus rábico, tanto na córnea como nas glândulas salivares parótidas, demonstrável através da imunofluorescência direta, 8 (26,66%) em um dos dois espécimens e nos 2 casos (6,66%) restantes, estes materiais comportaram-se de forma negativa por esta técnica (TABELA 2).

A diferença observada entre os resultados obtidos com o exame da córnea e das glândulas salivares submaxilares consistiu apenas de 6 (20%) amostras de córnea negativas. A mesma relação foi verificada entre a córnea e o encéfalo (TABELA 2).

A relação humor aquoso/glândulas salivares parótidas, evidenciou resultados positivos em 20 casos (66,66%) e negativos em 2 (6,66%). Entre os demais 8 pares de amostras (26,66%), o isolamento do vírus foi obtido em 5 (16,66%) amostras de humor aquoso e de 3 (10%) destas glândulas (TABELA 2).

Entre o humor aquoso e as glândulas salivares submaxilares, houve diferença em 5 casos (16,66%), cujas amostras negativas foram de humor aquoso. A mesma discrepância foi observada ao exame desse espécimen ocular e do encéfalo, através da inoculação intracerebral em camundongos (TABELA 2).

Os dados da TABELA 2 indicam que os 13 resultados discordantes entre as glândulas salivares, 6 (20%) à imunofluorescência direta e 7 (23,33%) à inoculação intracerebral em camundongos foram positivos para as submaxilares e negativos para as parótidas.

Dentre os diferentes espécimens estudados com parativamente por combinação dupla, não houve diferença en tre as glândulas salivares submaxilares e o encéfalo, em ne nhuma das técnicas utilizadas (TABELA 2). A taxa de positi vidade desses espécimens foi maior que a verificada nos de mais, havendo no entanto, diferença significativa somente em relação à córnea, o humor aquoso e as glândulas salivares pa rótidas.

TABELA 1 - Resultados do diagnóstico laboratorial realizado em cães com raiva natural, segundo a identificação do animal, natureza do espécimen colhido e a técnica utilizada, São Paulo, 1980.

ESPÉCIMEN	SALIVA		OCULARES		GLÂNDULAS SALIVARES				ENCÉFALO	
			CÓRNEA	H.AQUOSO	PARÓTIDAS		SUBMAXILARES			
TÉCNICA	IFD	IIC	IFD	IIC	IFD	IIC	IFD	IIC	IFD	IIC
Nº ANIMAL										
01	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
02	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P
03	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
04	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
05	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
06	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
07	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
08	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
09	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
10	P	P	N	P	N	P	P	P	P	P
11	P	P	P	N	N	P	P	P	P	P
12	P	P	P	P	N	P	P	P	P	P
13	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P
14	P	P	N	P	N	P	P	P	P	P
15	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P
16	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P
17	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18	P	N	P	N	P	N	P	P	P	P
19	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
20	P	P	P	P	P	N	P	P	P	P
21	P	P	N	P	P	N	P	P	P	P
22	P	P	P	P	P	N	P	P	P	P
23	P	P	P	N	N	N	P	P	P	P
24	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P
25	P	P	N	N	P	P	P	P	P	P
26	P	P	P	P	P	N	P	P	P	P
27	P	P	P	N	P	P	P	P	P	P
28	P	P	P	P	P	N	P	P	P	P
29	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P
30	P	P	P	P	N	P	P	P	P	P
T O T A L	29/30	26/30	24/30	25/30	24/30	23/30	30/30	30/30	30/30	30/30
% de POSITIVOS	96,66	86,66	80,00	83,33	80,00	76,66	100,00	100,00	100,00	100,00

IFD = Imunofluorescência Direta
 IIC = Inoculação Intracerebral em Camundongos
 N = Negativo
 P = Positivo
 * = Positivos/Examinados

TABELA 2 - Diagnóstico laboratorial realizado em cães com raiva natural, segundo a combinação pareada de espécimens para uma mesma técnica e a natureza dos resultados obtidos, São Paulo, 1980.

ESPÉCIMENS E TÉCNICAS	R E S U L T A D O S				TOTAL	
	POS/POS	NEG/NEG	POS/NEG	NEG/POS	POS	NEG
SALIVA IFD/CÓRNEA IFD	23	-	6	1	30	-
SALIVA IIC/HUMOR AQUOSO IIC	22	1	4	3	29	1
SALIVA IFD/PARÓTIDAS IFD	23	-	6	1	30	-
SALIVA IIC/PARÓTIDAS IIC	20	1	6	3	29	1
SALIVA IFD/SUBMAXILARES IFD	29	-	-	1	30	-
SALIVA IIC/SUBMAXILARES IIC	26	-	-	4	30	-
SALIVA IFD/ENCÉFALO IFD	29	-	-	1	30	-
SALIVA IIC/ENCÉFALO IIC	26	-	-	4	30	-
CÓRNEA IFD/PARÓTIDAS IFD	20	2	4	4	28	2
CÓRNEA IFD/SUBMAXILARES IFD	24	-	-	6	30	-
CÓRNEA IFD/ENCÉFALO IFD	24	-	-	6	30	-
HUMOR AQUOSO IIC/PARÓTIDAS IIC	20	2	5	3	28	2
HUMOR AQUOSO IIC/SUBMAXILARES IIC	25	-	-	5	30	-
HUMOR AQUOSO IIC/ENCÉFALO IIC	25	-	-	5	30	-
PARÓTIDAS IFD/SUBMAXILARES IFD	24	-	-	6	30	-
PARÓTIDAS IIC/SUBMAXILARES IIC	23	-	-	7	30	-
SUBMAXILARES IFD/ENCÉFALO IFD	30	-	-	-	30	-
SUBMAXILARES IIC/ENCÉFALO IIC	30	-	-	-	30	-

POS = Positivo

NEG = Negativo

IFD = Imunofluorescência direta

IIC = Inoculação Intracerebral em Camundongos

4. DISCUSSÃO.

4. DISCUSSÃO.

Os resultados obtidos no presente estudo, ressaltam aspectos importantes do diagnóstico da raiva, tanto "in vivo" como no "post-mortem".

O exame da saliva, mediante as técnicas de IFD e de IIC, permitiu confirmar o diagnóstico da raiva em 30 dos 30 cães estudados (100%), quando se consideram os resultados obtidos por uma e/ou outra técnica. No entanto, quando se analisam os dados isoladamente por técnica usada, verifica-se que a IFD revelou a presença de antígeno rábico em esfregaços de saliva de 29 dos 30 cães (96,66%), enquanto o isolamento do vírus por IIC foi evidenciado em 26 (86,66%).

As discrepâncias observadas entre os dois métodos aplicados ao exame da saliva ocorreram em 5 casos (16,66%), sendo negativos, 1 (3,33%) apenas à IFD e 4 (13,33%) somente à IIC.

Com relação aos resultados falso-negativos, verificados em uma ou outra técnica, tais observações estão de acordo com os resultados achados por VEERARAGHAVAN et alii⁷⁰, utilizando os mesmos recursos para demonstrar a presença do vírus rábico em amostras de saliva obtidas de um cão assintomático, portador de infecção natural.

Considerando-se os resultados positivos obtidos em ambas as técnicas aplicadas aos espécimens oculares, 20/30 (66,66%), apenas a IFD da córnea 4/30 (13,33%) e somente a IIC do humor aquoso 5/30 (16,66%), pode-se verificar que a conjugação desses testes permitiu revelar a raiva em 29 dos 30 cães estudados (96,66%). Embora a ocorrência do vírus não tenha sido demonstrada em ambos os espécimens concomitantemente, de todos os casos, resultados bem semelhantes foram observados entre eles, registrando-se 24/30 (80%) para o teste de córnea e 25/30 (83,33%) para o humor aquoso.

Estes valores não estão de acordo com as ta xas de sensibilidade encontradas por LARGHI et alii ³¹, 41,5%; MARTELL & ALDASORO ³⁸, 72,5% e REIS et alii ⁴⁹, 47,8%; ao e xame da córnea, bem como do humor aquoso ⁴⁹, 70,2%, do mes mo modo que os índices de positividade verificados entre os dois testes são discordantes dos observados por REIS et alii ⁴⁹, em condições similares.

No entanto, o fato de ter ocorrido resulta dos falso-negativos, tanto na córnea 5 (16,66%), como no hu mor aquoso 4 (13,33%) e em ambos simultaneamente 1 (3,33%) , corrobora apenas neste aspecto com as observações desses au tores ^{31, 38, 49}.

Apreciando-se o total de resultados positivos obtidos ao exame das glândulas salivares parótidas, através da IFD 24/30 (80%) e da IIC 23/30 (76,66%), pode-se atribuir, neste aspecto, a comparabilidade desses recursos, embora os índices de positividade sejam inferiores aos observados com a aplicação dessas técnicas aos espécimens utilizados usual mente no diagnóstico da raiva ^{5, 7, 39, 53}.

No entanto, a proporção alcançada mediante a combinação dos dois métodos, 29/30 (96,66%), está de acordo com os relatos de outros autores ^{5, 7, 10, 11, 32}, segundo os quais, a combinação dessas técnicas aumenta a eficiência do diagnóstico ^{7, 32}.

Mas, quando se analisam os resultados obtidos em cada uma das amostras examinadas pelas duas técnicas si multaneamente, verifica-se que houve concordância entre elas em 19 casos (63,33%), sendo 18 (60%) positivos e 1 (3,33%) ne gativo.

Relativamente às discrepâncias observadas en tre os dois procedimentos, estas foram em decorrência dos resultados falso-negativos registrados, 5 (16,66%) à IFD e 6 (20%) à IIC.

Perfeita concordância foi observada entre as técnicas de imunofluorescência direta e de inoculação intracerebral em camundongos, quando aplicadas concomitantemente aos espécimens de glândulas salivares submaxilares, cujos resultados foram invariavelmente positivos em todos os casos estudados (TABELA 1).

Concordam plenamente com esses resultados, os obtidos por SILVA et alii ⁶¹, ao exame desse material proveniente de 56 cães suspeitos de raiva, dos quais 24 foram positivos por ambas as técnicas.

No entanto, estas observações não estão de acordo com as de BEAUREGARD & CASEY ¹⁰, ao estudo das glândulas salivares submaxilares provenientes de 78 animais domésticos e silvestres, inclusive de 7 cães, comprovadamente raivosos, através do exame do material encefálico, dos quais 66 tiveram esse espécimen positivo e destes, 62 às duas técnicas simultaneamente.

Também foram diferentes dos nossos, os resultados observados por GOLDWASSER et alii ²⁶, 48 à IFD e 49 à IIC, de um total de 55 animais com o corno de Ammon positivo.

A positividade de 100% dos animais examinados, tanto à imunofluorescência direta, como à inoculação intracerebral em camundongos, aplicadas ao encéfalo, está de conformidade com as investigações de outros autores ^{10, 39, 64}, realizadas com animais domésticos e silvestres e especificamente em cães, mediante igual procedimento ^{39, 64}.

Apesar da comparabilidade dessas técnicas, para o diagnóstico da raiva a partir de espécimens encefálicos, completa concordância entre elas, como a encontrada neste estudo, e em outras investigações ^{10, 39, 61, 64}, não tem sido verificada em todas as oportunidades ^{11, 32, 53}.

As diferenças observadas entre as técnicas de imunofluorescência direta e de inoculação intracerebral em

camundongos ocorreram apenas no exame da saliva, dos espécimens oculares e das glândulas salivares parótidas, no entanto, estas não se revestiram de significância estatística segundo a análise realizada através da prova da binomial, ao nível de rejeição adotado de 0,05.

A combinação dos espécimens de saliva e de córnea para o diagnóstico da raiva "in vivo" por IFD propiciou elucidar a infecção em 100% dos casos estudados. Apesar de nenhum dos testes isoladamente ter apresentado 100% de eficiência, resultados mais próximos a estes foram observados ao exame da saliva, 29/30 (96,66%), em relação aos encontrados na córnea 24/30 (80%).

A ocorrência de resultados negativos, 1 (3,33%) à IFD da saliva e 6 (20%) ao teste de córnea, constitui a maior limitação desses métodos, quanto ao uso sistemático no diagnóstico da raiva, visando a orientação das medidas imediatas à suspeita da infecção nos reservatórios animais.

Esta conotação coincide com VEERARAGHAVAN et alii ⁷⁰, a respeito da saliva e com LARGHI et alii ³¹ e outros autores ⁴⁹, em relação à córnea.

A ocorrência do vírus em ambos os espécimens de saliva e de córnea revelada pela IFD paralelamente em 23 casos (76,66%) e em um ou outro material de 7 cães (23,33%), evidencia perspectiva para demonstrar a infecção rábica na maioria dos casos, através de um dos testes e em todos, mediante a utilização de ambos os métodos simultaneamente.

A associação da saliva e do humor aquoso por IIC, permitiu demonstrar o vírus da raiva em 29/30 (96,66%) dos cães estudados, a despeito dos menores índices de isolamento desse vírus quando cada um dos procedimentos foi apreciado isoladamente 26/30 (86,66%) e 25/30 (83,33%) respectivamente, apesar desses valores serem bem próximos.

A respeito da ocorrência de resultados idênticos em ambos os espécimens simultaneamente, houve concor

dância em 23 (76,66%) casos, sendo 22 (73,33%) positivos e 1 (3,33%) negativo.

As falhas observadas ao isolamento do vírus de um 3/30 (10%) ou outro 4/30 (13,33%) espécimens e em ambos 1/30 (3,33%), estão de acordo no aspecto da ocorrência de resultados falso-negativos verificados em investigações realizadas com saliva de cão ⁷⁰ e em relação ao humor aquoso ⁴⁹, embora discordem em alguns casos, com o exame da saliva ^{17, 19}, face ao sucesso obtido de 100% de positividade ^{17, 19}, por esses autores,

Os resultados obtidos através da IFD, pelo exame da saliva, 29/30 (96,66%) e das glândulas salivares parótidas, 24/30 (80%), estão confrontados com os observados entre a saliva 29/30 (96,66%) e a córnea 24/30 (80%), nas mesmas condições (TABELA 2). As duas relações mostram perfeita identidade tanto nos resultados concordantes, 23/30 (76,66%), positivos em ambos, como nos discordantes, 7/30 (23,33%), positivos apenas em um 6/30 (20%) ou outro 1/30 (3,33%) espécimen.

Embora a relação positivos/examinados, 26/30 (86,66%) e 23/30 (76,66%) observada respectivamente com a saliva e as glândulas salivares parótidas por IIC evidencie valores diferentes, porém próximos, a combinação dos resultados obtidos nos dois espécimens, mostra uma proporção numericamente superior 29/30 (96,66%), em relação aos verificados em cada um deles isoladamente.

A respeito da presença ou ausência do vírus em ambos simultaneamente (saliva e parótidas), uma associação não pode ser estabelecida em todas as oportunidades, porquanto, este fato ocorreu apenas em 21 casos (70%), dos quais 20 (66,66%) foram positivos e 1 (3,33%) negativo.

Os resultados positivos obtidos à IFD da saliva 29/30 (96,66%) e das glândulas salivares submaxilares 30/30 (100%) mostram uma associação perfeita entre ambos, de

29 cães, quanto a ocorrência simultânea de antígeno rábico e a diferença em 1 (3,33%) caso apenas, quando a saliva foi negativa por esta técnica. Estes dados permitem verificar que a mesma proporção de resultados ocorreu através da combinação dos espécimens de saliva e de encéfalo, mediante igual tratamento (TABELA 2).

A proporção observada entre a saliva e as glândulas salivares submaxilares, 26/30 (86,66%) e 30/30 (100%) respectivamente, por IIC, em termos de resultados, permite concluir por uma perfeita identidade, em relação à registrada entre a saliva e o encéfalo examinados pela mesma técnica (TABELA 2).

Estes dados diferem significativamente dos obtidos por VAUGHN et alii ⁶⁸, a partir de 54 cães raivosos, infectados experimentalmente, dos quais o vírus foi isolado de 33/54 (61%) das glândulas salivares submaxilares, de 26/54 (48%) da saliva e de 50/54 (92,6%) do encéfalo.

Comparando-se os resultados positivos obtidos ao exame da córnea, 24/30 (80%) e das glândulas salivares parótidas, 24/30 (80%) por IFD, verifica-se idêntica proporção, embora a conjugação de ambas tenha permitido comprovar a raiva em 28 (93,33%) dos 30 cães estudados. Todavia, a associação entre esses espécimens relativamente a ocorrência do vírus só foi observada em 20 casos (66,66%) e em relação à ausência em apenas 2 (6,66%) (TABELA 2).

A presença do vírus da raiva na córnea, 24/30 (80%) e nas glândulas salivares submaxilares, 30/30 (100%) simultaneamente, não foi, portanto, demonstrada em todos os casos pela IFD, uma vez que esse evento não foi observado na córnea de 6 animais (20%), dos quais as glândulas salivares foram positivas. As mesmas discrepâncias ocorreram entre a córnea e o encéfalo em idênticas condições (TABELA 2).

Com referência ao humor aquoso e as glândulas salivares parótidas, comparativamente, pode-se atribuir um comportamento similar quanto ao isolamento do vírus por IIC .

25 de 30 (83,33%) e 23 de 30 (76,66%) respectivamente.

Apesar da combinação desses espécimens ter propiciado um ligeiro aumento da eficiência do método, 28 de 30 (93,33%), a ocorrência de resultados falso-negativos não foi eliminada uma vez que, em 2 casos (6,66%), tal procedimento deixou de confirmar a infecção.

Relativamente à demonstração do vírus no humor aquoso e nas glândulas salivares parótidas simultaneamente e em um ou outro espécimen, houve concordância em 20 casos (66,66%) positivos, em 2 (6,66%) negativos e discrepâncias em 8 (26,66%) (TABELA 2).

Embora através do exame do humor aquoso, 5 dos 30 animais examinados (16,66%) não tenham apresentado vírus, à IIC, o diagnóstico da raiva por esta técnica foi efetivado a partir das glândulas salivares submaxilares em todos os animais (100%). Resultados inteiramente concordantes a estes foram observados entre o humor aquoso, 25/30 (83,33%) e o encéfalo 30/30 (100%), submetidos a igual tratamento (TABELA 2).

As diferenças observadas entre as glândulas salivares foram em decorrência das amostras de parótidas negativas, 6 (20%) à IFD e 7 (23,33%) à IIC, semelhantes em relação às técnicas, porém, diferentes relativamente aos espécimens.

Estas observações permitem considerar as submaxilares como espécimen mais apropriado para o diagnóstico em comparação com as parótidas (TABELA 2).

Com relação à presença do vírus da raiva em ambos os espécimens de glândulas salivares submaxilares e de encéfalo colhidos paralelamente dos mesmos animais, uma perfeita identidade pode ser evidenciada pelos resultados positivos observados em todos os casos, tanto à imunofluorescência direta como à inoculação intracerebral em camundongos (TABELA 2).

A demonstração do vírus rábico simultaneamente nas glândulas salivares submaxilares e no encéfalo, não tem sido registrada com a regularidade observada neste estudo, nem em condições naturais ^{10, 26, 38, 69} nem experimentais ⁶⁸, embora este evento tenha sido revelado por SAMOL ⁵¹, através da imunofluorescência direta aplicada a esses espécimens provenientes de animais domésticos e silvestres, encontrando, no entanto, dificuldade para elucidar o diagnóstico em 4 casos.

Dentre os vários espécimens comparados por combinação dupla através de uma mesma técnica, não houve diferença ou variação apenas entre as glândulas salivares submaxilares e o encéfalo, nem à imunofluorescência direta nem à inoculação intracerebral em camundongos.

No entanto, ao considerar-se o índice de positividade de 100%, obtido ao exame desses espécimens comparativamente aos demais, pode-se aduzir que houve diferenças significativas à análise estatística realizada através do teste da binomial apenas em relação à córnea, ao humor aquoso e às glândulas salivares parótidas, ao nível de rejeição adotado de 0,05.

Dentre os recursos estudados, os procedimentos a partir da saliva, da córnea e das glândulas salivares parótidas revelaram algumas limitações de natureza prática.

Cuidados especiais devem ser dispensados para colheita de espécimens "in vivo" envolvendo a imobilização dos animais por meios mecânicos e químicos e o treinamento adequado do pessoal técnico.

A reação de IFD aplicada à saliva e à córnea, requer uma leitura criteriosa, mais demorada, de maior número de impressões e de campos microscópicos, em relação ao exame das glândulas salivares submaxilares e do encéfalo.

As glândulas salivares parótidas diferiram significativamente dos demais espécimens tissulares, quanto à

demonstração do vírus e evidenciaram menor praticidade para colheita e processamento laboratorial.

No entanto, as desvantagens observadas ao exame da saliva e da córnea, não invalidam a importância e a possibilidade da utilização desses métodos para o diagnóstico "in vivo" e rápido da raiva em cães, particularmente em serviços especializados na profilaxia da enfermidade.

5. CONCLUSÕES.

5. C O N C L U S Õ E S.

A apreciação dos dados e os resultados da a nálise estatística, sugerem nas condições do presente estudo, as seguintes conclusões:

- As glândulas salivares submaxilares e o en céfalo foram mais apropriados como espéci mens para o diagnóstico da raiva, tanto à IFD como à IIC, tendo ambos apresentado uma taxa de positividade de 100%, significativa mente maior do que a observada com o exame da córnea, do humor aquoso e das glândulas salivares parótidas.
- A saliva quando tratada pelas técnicas de IFD e de IIC associadas, permitiu elucidar o diagnóstico em 100% dos cães estudados. Ressalte-se a ocorrência de resultados fal so-negativos em 1 (3,33%) e 4 (13,33%) ca sos, quando se empregou uma ou outra técni ca isoladamente.
- O tratamento da saliva e da córnea concomi tantemente pela IFD, revelou o diagnósti co da raiva em todos os animais estudados (100%), a despeito do registro de resulta dos falso-negativos em 1 (3,33%) e em 6 (20%) casos respectivamente, quando se con siderou o exame da saliva e o teste de cór nea independentemente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. ACHA, P. N. Algunas consideraciones sobre las condiciones actuales de la rabia en las Americas. Salud públ. Méx., 10: 9-14, 1968.
2. ACHA, P. N. & SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales. Washington, Organizacion Panamericana de la Salud, 1977. p.342-362, (OPAS - Publ. cient, 354).
3. AFSHAR, A. et alii. A contribution to the detection of inapparent rabies in stray dogs. Occurrence of precipitating antibodies in sera and antigens in salivary glands and saliva. Vet. Rec., 91: 562-5, 1972.
4. AFSHAR, A. & BAHMANYAR, M. Non-fatal rabies virus infections. Vet. Bull., 48: 553-8, 1978.
5. ATANASIU, P. et alii. Limites du diagnostic de la rage au laboratoire. Rec. Med. vet. École Alfort, 144: 1083-8, 1968.
6. ATANASIU, P. et alii. Contribution a l'étude de la rage experimentale du renard. Ann. Inst. Pasteur, 119: 260-9, 1970.
7. ATANASIU, P. Animal inoculation and Negri body. In: BAER, G.M., ed. The natural history of rabies. New York, Academic Press, 1975. v. 1, p. 373-400.

DE ACORDO COM: ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. Referências bibliográficas em ciências biomédicas. São Paulo, Divisão de Biblioteca e Documentação da USP, 1971.

8. BAGNAROLI, R. A. et alii. Susceptibilidad de ratones lactentes y adultos ao virus rabico demonstrada por inmunofluorescencia. Bol. Ofic. sanit. panamer., 48: 388-92, 1970.
9. BAUER, A. G. Possibilidade do diagnóstico "in vivo" da raiva, pelo exame das fossas nasais. Bol. Inst. Pesq. vet. Desiderio Finamor, 3: 125-31, 1975.
10. BEAUREGARD, M. & CASEY, G. A. Demonstration of rabies antigen in salivary glands of rabies suspected animals. Canad. J. comp. Med., 33: 55-8, 1969.
11. BEAUREGARD, M. et alii. The use of fluorescent antibody staining in the diagnosis of rabies. Canad. J. comp. Med. vet. Sci., 29: 141-7, 1965.
12. BEDFORD, P. G. C. Diagnosis of rabies in animals. Vet. Rec., 99: 160-2, 1976.
13. BESEDA, M. Reliability of the corneal test in the diagnosis of rabies; comparative studies. Vet. Cas., 14: 121-3, 1972.
14. BLENDEN, D. C. Diagnosis of rabies in various species by immunofluorescent staining of skin. J. Amer. vet. med. Ass., 165: 735, 1974.
15. BRYCESON, A. D. M. et alii. Demonstration during life of rabies antigen in humans. J. infect. Dis., 131: 71-4, 1975.
16. CIFUENTES, E. et alii. Rabies in a child diagnosed by a new intra-vitam method. The cornea test. J. trop. Med. Hyg., 74: 23-5, 1971.
17. CLEMMER, D. I. et alii. Estudio sobre la rabia canina en la ciudad de Cali. Bol. Ofic. sanit. panamer., 69: 212-20, 1970.

18. CÔRTEZ, J. de A. & NILSSON, M. R. Isolamento de vírus rábico de cães aparentemente normais inoculados experimentalmente. Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 12, 223-8, 1975.
19. CÔRTEZ, V. de A. Estudo da sensibilidade de um sistema biológico empregado no diagnóstico da raiva. São Paulo, 1978, (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da USP).
20. CRICK, J. & BROWN, F. Rabies vaccines for animals and man. Vet. Rec., 99: 162-7, 1976.
21. DONE, J. T. et alii. Laboratory diagnosis of rabies. Vet. Rec., 99: 259, 1976.
22. EDWARDS, S. J. Laboratory diagnosis of rabies in the dog. Vet. Rec., 99: 301, 1976.
23. FEKADU, M. Asymptomatic non-fatal canine rabies. Lancet, 1: 569, 1975.
24. FUH, T. H. Fluorescent antibody test frozen sections for diagnosis of rabies. J. Chinese Soc. vet. Sci., 1: 58-71, 1975.
25. GOLDWASSER, R. A. & KISSLING, R. E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 98: 219-23, 1958.
26. GOLDWASSER, R. A. et alii. Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in the salivary glands of rabid animals. Bull. Wld Hlth Org., 20: 579-88, 1959.
27. JOHNSON, H. N. Rabies virus. In: LENNETTE, E. H. & SCHMIDT, N. J., ed. Diagnosis procedures for viral and rickettsial diseases. 3rd ed. New York, American Health Association, 1969. p. 356-380.

28. KAPLAN, M. M. Evaluacion de las tecnicas de laboratorio aplicables al diagnostico y a prevencion de la rabia y a las investigaciones antirrabicas. In: KAPLAN, M. M. & KOPROWSKI, H. La rabia: tecnicas de laboratorio. 3a. ed. Ginebra, Organizacion Mundial de la Salud, 1976. p. 19-26. (OMS - Serie de monografias, 23).
29. KISSLING, R. E. The fluorescent antibody in rabies. In: BAER, G. M. ed. The natural history of rabies, New York, Academic Press, 1975. v. 1. p. 401-416.
30. KOPROWSKI, H. Prueba de inoculacion en ratones. In: ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Tecnicas de laboratorio aplicadas a la rabia. Ginebra, 1956. p. 57-69, (Serie de monografias, 23).
31. LARGHI, O. P. et alii. Evaluation of the corneal test as a laboratory method for rabies diagnosis. Appl. Microbiol., 25: 187-9, 1973.
32. LARGHI, O. P. Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia. Buenos Aires, Centro Panamericano de Zoonosis, 1975. (Nota tecnica, 8).
33. LARGHI, O. P. et alii. Sensitivity of BHK-21 cells supplemented with diethylaminoethyl-dextran for detection of street rabies virus in saliva samples. J. clin. Microbiol., 1: 243-5, 1975.
34. LEACH, C. N. Comparative methods of diagnosis of rabies in animals. Amer. J. publ. Hlth, 28: 162-6, 1938.
35. MANCISIDOR, N. A. & ARELLANO, C. Aislamiento de virus rabico en cultivos celulares a partir de saliva. Tec. Pec. Méx., 18: 89-92, 1971.
36. MARKSON, L. M. et alii. A biological test for rabies using suckling mice. Trop. Anim. Hlth Prod., 3: 89-92, 1971.

37. MARTELL, D. M. A. et alii. Detección de fluorescencia específica a rabia antes de la aparición de signos en ratones inoculados intracerebralmente con 5 cepas de virus rábico con y sin dimetil-sulfóxido (DMSO). Tec. Pec. Méx., 12/13: 28-32, 1969.
38. MARTELL, D. M. A. & ALDASORO, M. A. Detección de virus rábico. Bol. Ofic. sanit. panamer., 73: 117-23, 1972.
39. McQUEEN, J. L. et alii. Rabies diagnosis by fluorescent antibody. I. Evaluation in a public health laboratory. Amer. J. publ. Hlth, 50: 1743-52, 1960.
40. MOREIRA, E. C. & REIS, R. Pesquisa do vírus da raiva no humor aquoso, saliva, glândula salivar submaxilar e córnea de bezerros inoculados experimentalmente. Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais, 27: 335-49, 1975.
41. NILSSON, M. R. & SUGAY, W. Diagnóstico da raiva- Comparação entre a pesquisa de inclusões em esfregaços e a inoculação de camundongos. Arq. Inst. biol., S. Paulo, 33: 11-6, 1966.
42. NILSSON, M. R. & SUGAY, W. O uso de camundongos lactentes no diagnóstico da raiva. Arq. Inst. biol., S. Paulo, 33: 47-8, 1966.
43. NILSSON, M. R. et alii. Rabies diagnosis. Comparative study on susceptibility of adult and suckling mice. Arq. Inst. biol., S. Paulo, 35: 43-7, 1968.
44. NILSSON, M. R. Revisão do conceito de que a raiva é sempre fatal. Bol. Ofic. sanit. panamer., 68: 486-94, 1970.
45. NILSSON, M. R. O problema do portador em raiva. Bol. Ofic. sanit. panamer., 67: 195-205, 1969.
46. NILSSON, M. R. & CORTES, J. de A. Recuperação espontânea de um cão raivoso experimentalmente infectado. Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 12: 229-34, 1975.

47. PAWAN, J. L. et alii. Infectivity of the saliva in paralytic rabies. Ann. trop. Med. Parasit., 31: 267-70, 1937.
48. PILO MORON, E. et alii. Diagnostic rapide de la rage par l'inoculation du cerveau et de la glande sous-maxillaire aux souris et par l'immunofluorescence. Arch. Inst. Pasteur Algérie, 45: 5-10, 1967.
49. REIS, R. et alii. Presença do vírus rábico na córnea, humor aquoso e nervo óptico de humanos, bovinos, felinos e caninos com raiva. Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais, 23: 207-14, 1971.
50. REIS, R. & SILVA, J. M.L. Diagnóstico comparativo da raiva pela imunofluorescência e exames histopatológicos do gânglio de Gasser, corno de Ammon, glândulas salivares submaxilares e adrenais. Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais, 19: 39-45, 1967.
51. SAMOL, S. The role of submaxillary salivary glands in the laboratory diagnosis of rabies. Bull. Off. int. Epiz., 86: 259-65, 1976.
52. SAINZ, C. C. El uso de anticuerpos fluorescentes en el estudio de algunas enfermedades infecciosas. III. Aplicaciones de las técnicas de inmunofluorescencia al estudio de la rabia. Gac. med. Mex., 94: 315-7, 1964.
53. SCHAAF, J. Technique and value of the microscopic diagnosis of rabies. II. Demonstrating the antigen by the fluorescent antibody technique. Zbl. Vet. Med., Reihe B, 15: 249-58, 1968.
54. SCHAAF, J. & SCHAAAL, E. Virus localization in rabies. Dtsch. tierärztl. Wschr., 75: 315-23, 1968.

55. SCHAAF, J. & SCHAAL, E. Comparative examinations on the diagnostic value of the cornea test, the nose test and mouth test for the diagnosis of rabies performed on rabies-positive necropsy material. Dtsch. tierärztl. Wschr., 78: 341-6, 1971.
56. SCHNEIDER, L. G. The cornea test; a new method for the intra-vitam diagnosis of rabies. Zbl. Vet. Med., Reihe B, 16: 24-31, 1969.
57. SCHNEIDER, L. G. Spread of virus from the central nervous system. In: BAER, G. M., ed. The natural history of rabies. New York, Academic Press, 1975, v. 1. p. 273-301.
58. SIEGEL, S. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. New York, McGraw Hill, 1956.
59. SIKES, R. K. Pathogenesis of rabies wildlife. I. Comparative effect of varying doses of rabies virus inoculated into foxes and skunks. Amer. J. Vet. Res., 23: 1041-7, 1962.
60. SILVA, R. A. & SOUZA, A. M. Ocorrência do vírus da raiva em diferentes tecidos de cão na doença natural. Pesq. Agropec. bras., Ser. Vet., 3: 317-8, 1968.
61. SILVA, R. A. et alii. A utilização do método de imunofluorescência comparativamente com os métodos histoquímico e biológico no diagnóstico da raiva. Pesq. Agropec. bras. Ser. Vet., 8: 1-4, 1973.
62. SILVA, R. A. & SILVA, N. M. Infecção rábica em cão com presença de vírus virulento nas glândulas salivares e avirulência no encéfalo. Pesq. Agropec. bras., Ser. Vet., 8: 89-90, 1973.
63. SMITH, W. B. et alii. Diagnosis of rabies by immunofluorescent staining of frozen sections of skin. J. Amer. vet. med. Ass., 161: 1495-501, 1972.

64. SUBRAHMANYAM, B. & PATHAK, R. C. Diagnosis of rabies in dogs - Comparative study on microscopic, biological and fluorescent antibody tests for diagnosis. Indian Vet. J., 48: 123-7, 1971.
65. TIERKEL, E. S. Canine rabies. In: BAER, G. M. ed. The natural history of rabies. New York, Academic Press, 1975. v. 2, p. 123-37.
66. TIERKEL, E. S. Envio de muestras y tecnicas de preparacion de los tejidos animales. In: KAPLAN, M.M. & KO PROWSKI, H. La rabia: tecnicas de laboratorio. 3a.ed. Ginebra, Organizacion Mundial de la Salud, 1976.p.29-57. (OMS - Serie de monografias, 23).
67. VALLONE, E. F. et alii. Rabia humana. Diagnostico pre-mortem" a partir de la saliva por inmunofluorescencia. Arch. Pediat. Uruguay, 37: 563-7, 1966.
68. VAUGHN, J. B. et alii. Excretion of street rabies virus in the saliva of dogs. J. Amer. med. Ass., 193: 363-8, 1965.
69. VEERARAGHAVAN, N. et alii. Virus content of brains and submaxillary glands and occurrence de Negri bodies in animals suspected of having died of natural rabies infection. Bol. Org. Mund. Salud., 18: 469-71, 1958.
70. VEERARAGHAVAN, N. et alii. Studies on the salivary excretion of rabies virus by dog from Surandai. Sci. Rep. Pasteur Inst. Sth. India. p. 66-70, 1969.
71. WEBSTER, L. T. & DAWSON, J. R. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. Proc. Soc.exp. Biol. Med., 32: 570-3, 1935.
72. ZIMMERMANN, T. The aplicability of the cornea test in rabies diagnosis. Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 84: 172-4, 1971.