

CLAUDIA SALETE WISSER

**RAIVA BOVINA: EVOLUÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA E SUA RELAÇÃO COM
A INTENSIDADE DE LESÕES E MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências
Agroveterinárias, da Universidade do Estado de
Santa Catarina como requisito para obtenção do
grau de Doutora em Ciência Animal, na área de
concentração de Patologia Animal.

Orientadora: Sandra Davi Traverso

**LAGES
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Wisser, Claudia Salete

Raiva bovina: evolução clínica da doença e sua
relação com a intensidade de lesões e métodos de
diagnóstico / Claudia Salete Wisser. - Lages , 2018.
70 p.

Orientadora: Sandra Davi Traverso

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages,
2018.

1. Raiva Bovina. 2. Eutanásia. 3. Histologia. 4.
Diagnóstico Laboratorial. I. Davi Traverso, Sandra.
II. Universidade do Estado de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação. III. Título.

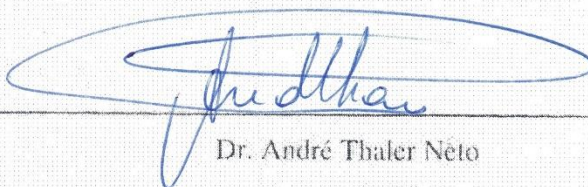
CLAUDIA SALETE WISSER

**RAIVA BOVINA: EVOLUÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA E SUA RELAÇÃO COM A
INTENSIDADE DE LESÕES E MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal como requisito para
obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Banca Examinadora:

Presidente: _____



Dr. André Thaler Neto

CAV/UDESC

Membro: _____



Dr. David Driemeier

UFRGS

Membro: _____



Dr. Aldo Gava

CAV/UDESC

Membro: _____



Dr. Carla Rosane Rodenbusch

Secretaria da Agricultura/RS

Membro: _____



Dr. Ubirajara Maciel da Costa

CAV/UDESC

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus pela força e coragem em todos os momentos, meu porto seguro para encarar todas as dificuldades.

A minha maior inspiração, minha filha Eloisa, que me motiva a cada dia ser uma pessoa melhor.

A minha família por todo apoio incondicional, meu pai pelo exemplo de vida, de fé e de dedicação, ao meu irmão pelo apoio e incentivo e minha querida mãe que ao lado de Deus esteve me abençoando todo tempo. Amo vocês!

Ao meu marido Adriano, por todo amor, carinho e principalmente paciência ao longo dessa jornada. Obrigada por estar sempre incondicionalmente me apoiando.

A minha orientadora, prof^a Sandra. Sem essa mulher incrível nada disso seria possível. Vou levar para toda minha vida seus conselhos e exemplos de força e fé. **MUITO OBRIGADA!**

Aos professores, colegas de pós e graduandos do laboratório de patologia animal CAV/UDESC.

Professor Gava, obrigada pelos conselhos e por me inspirar e me motivar pelo exemplo a trabalhar com essa área tão fascinante da veterinária.

Ao professor André Thaler, pelo auxílio na estatística.

Ao laboratório Pasteur em especial Dra Helena e Dr Enio pela execução das análises moleculares.

A UDESC, pelo conhecimento e oportunidade concedida.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado, importante para auxílio a pesquisa.

Enfim todos que colaboraram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse concluído...

Muito obrigada!

“Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã.”

(Chico Xavier)

RESUMO

A maioria das técnicas aplicáveis no diagnóstico de raiva bovina são amplamente conhecidas, assim como as lesões que a doença causa no sistema nervoso dos animais afetados, contudo os fatores que podem influenciar na eficácia dos métodos de diagnóstico e na intensidade das lesões histológicas são poucos discutidos. Esta tese propôs estudar a sensibilidade dos métodos de diagnóstico de raiva em bovinos mortos naturalmente e eutanasiados e a influência da evolução clínica, linhagem genética do vírus e quantificação viral no surgimento das lesões histológicas. Para isso foram coletadas, no Estado de Santa Catarina, amostras de encéfalos de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da raiva, mortos naturalmente ou eutanasiados para exame. Os bovinos foram divididos em quatro grupos: Animais eutanasiados em estação, eutanasiados em decúbito esternal, eutanasiados em decúbito lateral e morte espontânea. Para as análises da influência da eutanásia no diagnóstico de raiva bovina, amostras de cerebelo, tronco e córtex dos diferentes grupos foram submetidas a imunofluorescência direta (IFD), imuno-histoquímica (IHQ), citologia com Shorr e histopatologia com Hematoxilina e Eosina (HE) sendo avaliada a positividade de cada teste. Todas as técnicas de diagnóstico apresentaram casos positivos em todos os grupos analisados. Cada caso foi positivo em pelo menos dois métodos de diagnóstico, independente do estágio evolutivo da doença. A IHQ foi positiva em 100% dos casos, seguido pela IFD em 97%, HE 91% de positivos e Shorr 79%. Todos os casos que continham Corpúsculos de Negri foram positivos para raiva nos demais testes. A eutanásia em estágios evolutivos precoce da doença não comprometeu a eficácia da IFD e da IHQ. Para estudar os parâmetros que influenciam a intensidade da lesão inflamatória e a presença de corpúsculos de Negri, as amostras de sistema nervoso central (SNC) coletadas foram divididas em 11 áreas de análise histológicas coradas por HE. A intensidade de lesões foi graduada como ausentes, leve, moderado e acentuado e os corpúsculos de Negri em presentes ou ausentes. Um pool contendo amostras de cerebelo, tronco encefálico e córtex foram submetidas ao isolamento viral com avaliação da filogenia e análise da carga viral por Reação da Polimerase em Cadeia por Transcriptase Reversa (RT-PCR). com avaliação da filogenia e análise da carga viral por RT-PCR. Em todos os grupos analisados observaram-se lesões histológicas que variaram de leve a acentuado. As regiões encefálicas com maior intensidade de lesão inflamatória foram o óbex, seguido pelo colículo e tálamo. Os corpúsculos de Negri foram observados em maior porcentagem no cerebelo, óbex, complexo estriado e córtex frontal. A evolução clínica da doença não influenciou na intensidade de lesão inflamatória, mas influenciou a presença dos corpúsculos de Negri, que foram observados mais frequentemente em bovinos mortos naturalmente. Todas as amostras RABV detectadas apresentam linhagem genética característica de morcegos hematófagos *D. rotundus*. Das 31 amostras coletadas 9 amplificaram, e nessas análises a quantidade de vírus não teve relação com a média da intensidade de lesão, a evolução clínica da doença e presença do corpúsculo de Negri.

Palavras chaves: Raiva bovina. Diagnóstico laboratorial. Eutanásia. Histologia.

ABSTRACT

Most of the techniques applicable in the diagnosis of bovine rabies are widely known, as are the lesions that the disease causes in the nervous system of the affected animals, however the factors that may influence the efficacy of the diagnostic methods and the intensity of the histological lesions are few discussed. This thesis proposed to study the sensibility of rabies diagnosis methods in naturally dead and euthanized, and the influence of clinical evolution, genetic lineage of the virus and viral quantification in the emergence of histological lesions. For this, samples of bovine brain naturally infected with the rabies virus were collected in the State of Santa Catarina, naturally dead or euthanized for examination. The cattle were divided into four groups: Animals euthanized in standing, euthanized in sternal decubitus, euthanized in lateral decubitus and spontaneous death. For the analysis of the influence of euthanasia on the diagnosis of bovine rabies, cerebellum, trunk and cortex samples from the different groups were submitted to direct immunofluorescence (DIF), immunohistochemistry (IHC), Shorr cytology and histopathology with Hematoxylin and Eosin (HE) being evaluated the positivity of each test. All diagnostic techniques presented positive cases in all groups analyzed. Each case was positive in at least two diagnostic methods, regardless of the evolutionary stage of the disease. IHC was positive in 100% of cases, followed by DIF with 97%, HE with 91% positive and Shorr with 79%. All cases containing Negri bodies were positive for rabies in the remaining tests. Euthanasia in early evolutionary stages did not compromise the effectiveness of the DIF and IHC. To study the parameters that influence the intensity of the inflammatory lesion and the presence of Negri bodies, the collected CNS samples were divided into 11 histological analysis areas stained by HE. The intensity of the lesions was graded as absent, mild, moderate and accentuated and the Negri bodies in present or absent. A pool containing samples of cerebellum, brainstem and cortex were submitted to viral isolation with phylogeny evaluation and viral load analysis by RT-PCR. In all groups analyzed, intensities of histological lesions were observed ranging from mild to severe. The brain regions with the highest inflammatory lesion were the obex, the colliculus and the thalamus. Negri bodies were observed in a higher percentage in the cerebellum, obex, corpus striatum and frontal cortex. The clinical evolution of the disease did not influence the intensity of the inflammatory lesion, but it influenced the presence of the Negri bodies, which were observed more frequently in naturally dead cattle. All detected RABV samples show a genetic lineage characteristic of hematophagous bats *D. rotundus*. Of the 31 samples collected, 9 amplified, and in these analyzes the amount of virus had no relation with the mean of the lesion intensity, the clinical evolution of the disease and presence of the Negri bodies.

Keywords: Bovine rabies. Laboratory diagnosis. Euthanasia. Histology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Histologia do SNC de bovino positivo para raiva. A) Infiltrado mononuclear leve com até duas camadas de células inflamatórias perivascular e gliose leve. B) Infiltrado mononuclear moderado com 3-4 camadas de células inflamatórias perivascular. C) Infiltrado mononuclear moderado com mais de 4 camadas de células inflamatórias perivascular. HE, Obj 40x. 50
- Figura 2-Árvore filogenética de distância com algoritmo Neighbor-joining e modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros (K2p) construída a partir de 1.314 nucleotídeos do gene N que codifica a nucleoproteína do vírus da raiva (RABV), evidenciando os clados 1 no qual estão todas as amostras desse estudo indentificados como linhagem genética característica de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*...56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de casos positivos e porcentagem para cada teste de diagnóstico nos diferentes grupos de análise.	38
Tabela 2 - Estimativa da intensidade de lesão em cada região encefálica.	51
Tabela 3 - Intensidade das lesões histológicas, por área encefálica, nos diferentes grupos de evolução clínica.	52
Tabela 4 - Porcentagem de corpúsculos de inclusão de Negri nas diferentes regiões encefálicas.	53
Tabela 5 - Presença de corpúsculo de Negri, por área encefálica, nos diferentes grupos de evolução clínica, nos diferentes animais.	54
Tabela 6 - Efeito da evolução clínica da raiva na presença do corpúsculo de Negri e na intensidade de lesão inflamatória.	55
Tabela 7 - Relação entre as variáveis evolução clínica, média de lesão, quantidade e tipo de vírus.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CB	Cerebelo
CE	Complexo estriado
CF	Córtex frontal
CO	Colículo
GT	Gânglio trigêmeo
HE	Hematoxilina e Eosina
HI	Hipocampo
ICQ	Imunocitoquímica
IFD	Imunofluorescência direta
IHQ	Imunohistoquímica
IIC	Inoculação intracerebral em camundongo
ME	Medula espinhal
NA	Não avaliado
OB	Óbex
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
qRT-PCR	Reação da Polimerase em Cadeia por Transcriptase Reversa Quantitativo
RABV	Vírus da Raiva
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação da Polimerase em Cadeia por Transcriptase Reversa
SNC	Sistema nervoso central
TA	Tálamo
TO	Telencéfalo occipital
TP	Telencéfalo parietal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1	ETIOLOGIA.....	23
2.2	EPIDEMIOLOGIA.....	24
2.3	PATOGENIA.....	25
2.4	SINAIS CLÍNICOS.....	26
2.5	LESÕES.....	27
2.6	DIAGNÓSTICO DE RAIVA.....	28
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	ARTIGO CIENTÍFICO I: EFICÁCIA DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA RAIVA BOVINA NOS DIFERENTES ESTAGIOS DE EVOLUÇÃO DA DOENÇA.....	35
4.1	RESUMO.....	35
4.2	ABSTRACT.....	35
4.3	INTRODUÇÃO.....	36
4.4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.5	RESULTADOS.....	37
4.6	DISCUSSÃO.....	38
4.7	REFERÊNCIAS	41
5	ARTIGO CIENTÍFICO II: INFLUÊNCIA DA EVOLUÇÃO CLÍNICA, CARGA VIRAL E LINHAGEM GENÉTICA DO VIRUS DA RAIVA NA INTENSIDADE DE LESÕES HISTOLÓGICAS.....	45
5.1	RESUMO.....	45
5.2	ABSTRACT.....	45
5.3	INTRODUÇÃO.....	46
5.4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
5.4.1	Histopatologia, IHQ E IFD.....	47
5.4.2	Deteção e caracterização molecular e quantificação do vírus da Raiva.....	48
5.4.3	Análise estatística.....	49
5.5	RESULTADOS.....	49
5.6	DISCUSSÃO.....	57
5.7	CONCLUSÕES.....	59
5.8	REFERÊNCIAS.....	59
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma infecção neurológica zoonótica, fatal e progressiva causada pelo vírus da raiva do gênero *Lyssavirus* e família *Rhabdoviridae*. Afeta todos os animais de sangue quente. A doença é descrita em todo o mundo e endêmica em muitos países, exceto em ilhas como Austrália e Antártica. Anualmente mais de 60.000 pessoas morrem devido à raiva, e aproximadamente 15 milhões de pessoas recebem profilaxia pós-exposição à raiva (SINGH et al., 2017).

Estudo realizado no sul do Brasil, evidenciou que a doença foi responsável por 49,51% dos casos de doença neurológica em bovinos diagnosticada num período de 36 anos. Além das perdas diretas, as indiretas são muito grandes, como na queda de produção de leite, carne e couro, bem como nos custos de tratamento de profissionais e pessoas que tiveram contato, especialmente com a saliva de animais portadores do vírus e que poderão se infectar se não forem tratados e vacinados (SANCHES et al., 2000).

O quadro clínico da Raiva é conhecido e caracterizado pelas formas clínicas paralítica e furiosa (RADOSTITS et al., 2002). Macroscopicamente não são observadas lesões significativas. Os achados histopatológicos são limitados ao sistema nervoso central e incluem meningoencefalite e meningomielite linfoplasmocitária, associadas com ganglioneurite (MAXIE; YOUSSELF, 2006). Os corpúsculos de Negri, embora nem sempre observados, são característicos da infecção pelo vírus da Raiva (ZACHARY, 2009).

O diagnóstico oficial da raiva é dado pela imunofluorescência direta (IFD) e isolamento viral. Contudo a observação de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (corpúsculo de Negri) no exame histopatológico de Hematoxilina e Eosina (HE) (LANGOHR et al., 2003), a marcação antigênica na imuno-histoquímica (IHQ), em amostras pré-fixadas em formol e técnicas de histoquímica como Seller's (TEKKI et al., 2016) podem auxiliar no diagnóstico.

Apesar de estas inúmeras técnicas serem aplicadas rotineiramente como métodos de diagnóstico para raiva não existem trabalhos que estudem a relação do tempo de morte ou eutanásia com a positividade dos testes. De forma semelhante, as lesões geradas no sistema nervoso por ação do vírus são bastante conhecidas, contudo há poucos estudos correlacionando a intensidade e distribuição das lesões ao tempo de morte do animal.

Acredita-se que vários fatores podem influenciar nas lesões histológicas de raiva em bovinos. Segundo Fernandes, Riet-Correa (2007) para o corpúsculo de Negri, por exemplo, o estágio e curso da doença, além da cepa e concentração do vírus são determinantes no seu aparecimento. A severidade das lesões teoricamente aumenta com a progressão da doença,

entretanto não se sabe se as chances de se estabelecer um diagnóstico laboratorial são maiores em animais mortos naturalmente ou eutanasiados para exame (SWANEPOEL, 2004).

Este estudo foi dividido em duas etapas e teve como objetivos avaliar a influência da evolução clínica, a linhagem genética viral e concentração viral na intensidade das lesões inflamatórias e na presença de corpúsculos de Negri em bovinos infectados naturalmente pelo vírus da raiva. Além disso estudar a influência da eutanásia na eficácia das técnicas utilizadas rotineiramente para o diagnóstico de raiva bovina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ETIOLOGIA

A Raiva é uma doença infecciosa, de notificação obrigatória que acomete o sistema nervoso central (SNC) de várias espécies (FAIZEE et al., 2012; BEIGH et al., 2015; BARROS et al., 2006). Causa encefalomielite aguda com capacidade de afetar todos os animais de sangue quente, incluindo humanos e muitas espécies silvestres que podem servir como reservatórios ao vírus (RUPPRECHT; GIBBONS, 2004)

A doença é causada por RNA vírus, de sentido negativo, fita simples pertencente ao gênero *Lyssavirus* da família *Rhabdoviridae* e ordem *Mononegavirale* (<http://ictv.global/9th-report/>). O genoma do vírus da raiva (RABV) é composto pelas proteínas N, P e L que formam o complexo ribonucleoprotéico, este auxilia na multiplicação do vírus no citoplasma das células hospedeiras. Além disso expressa a proteína de superfície G que é responsável pela patogenicidade do vírus e indução da imunidade contra o vírus (ALBERTINI et al., 2011; ZHU; GUO, 2016).

Através de análise filogenética, 7 genótipos distintos de RABV são descritos (HEATON; MCELHINNEY; LOWINGS, 1999). O RABV clássico (RV-Genótipo1) e suas cepas são conhecidos mundialmente por causarem raiva em humanos e animais. Os genótipos 2 (Vírus de morcego de Lagos), genótipo 3 (vírus Mokola) e genótipo 4 (vírus Duvenhage) são amplamente distribuídos na África, enquanto o *Lyssavirus* de morcego europeu (EBLs 1 e 2; genótipos 5 e 6, respectivamente) estão limitados a Europa Ocidental e Oriental. Um novo genótipo, o 7º foi identificado como *Lyssavirus* de morcego australiano (ABLV) (PAWESKA et al., 2006). Nas Américas, todas as amostras do gênero *Lyssavirus* isoladas pertencem ao genótipo 1, portanto amostras “clássicas” do vírus (RODRIGUEZ et al., 2007).

O vírus da raiva é destruído por solventes lipídicos e em pH baixos (BARROS et al., 2006; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Fora do hospedeiro, sua resistência é baixa. É inativado a temperaturas altas, porém pode se manter estável por longos períodos a 4°C e até por vários anos a -20°C ou conservado em glicerina tamponada. Além disso, sofre inativação também sob a ação da luz solar, radiação ultravioleta, hipoclorito de sódio, soda cáustica a 2% e formalina (RODRIGUEZ et al., 2007).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Todos os mamíferos são suscetíveis à raiva e podem transmitir o RABV, mas há grande variabilidade interespecies entre os mamíferos na capacidade de atuar como reservatórios (SINGH et al., 2017).

O RABV circula com dois ciclos epidemiológicos inter-relacionados, isto é, ciclo urbano e ciclo silvestre, tendo principalmente cães de estimação, gatos e mamíferos selvagens como raposa, guaxinim, chagal, lobo, texugo, mangusto e morcegos, etc., como vetores / reservatórios, respectivamente (ESCOBAR et al., 2013). No entanto, ambos os ciclos podem se sobrepor em algumas situações geográficas (BLANTON et al., 2009).

Os reservatórios animais do vírus da raiva variam entre as regiões geográficas (YANG et al., 2013). Na Ásia e África a mordida de cão é responsável por 85 a 95% dos casos de raiva em humanos (FITZPATRICK et al., 2012). No Brasil, em várias regiões o ciclo urbano vem sendo controlado através de vacinação dos animais de companhia (WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011). Com isso se alcançou significativa redução nas taxas de mortalidade por raiva humana nos últimos 30 anos. Eventualmente são relatados casos esporádicos ou acidentais. Em 2017, foram registrados seis casos de raiva humana, todos pela variante 3 de morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*), sendo que cinco deles em razão de agressões diretas por morcegos hematófagos (BRASIL, 2018).

Já os ciclos silvestres apresentam-se em constante expansão, com maior número de casos registrados (WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011). Morcegos são considerados importantes reservatórios de vida selvagem para variantes do RABV. As últimas descobertas sugerem que pequenas mordidas aparentemente insignificantes e despercebidas de morcegos desempenha um papel importante na transmissão de RABV, porque a saliva de morcegos infectados contém RABV (SINGH et al., 2017). A maioria das variantes identificadas no país são representadas por isolados de origem não hematófago. Adaptações do vírus a morcegos não hematófagos traz uma preocupação especial devido a possibilidade do contato com humanos, pois algumas espécies são bastante comuns no meio urbano (SCHAEFER et al., 2005).

Quando se trata de raiva bovina, no sul do Brasil entre a década de 70 e meados da década de 80, houve aumento no número de casos e a partir disso, devido provavelmente ao combate de morcegos, esse número sofreu um decréscimo (SANCHES et al., 2000). No estado do Rio Grande do Sul (RS), a raiva bovina associada ao morcego hematófago historicamente ocorreu endemicamente em regiões bem definidas e restritas ao invés de amplamente distribuídas (BRASIL, 2014). Assim em muitas dessas áreas a vacinação maciça de gado deixou

de ser uma prática corriqueira. Contudo a partir de 2012 surgiram focos em áreas até então consideradas livres. Dessa maneira o diagnóstico tornou-se uma tarefa difícil para alguns laboratórios que até então sempre trabalharam com número limitado de casos anualmente (KANITZ et al., 2015). Dados de 2017 demonstram que em todo país a espécie bovina teve maior número de casos de raiva relatados (BRASIL, 2018).

Em Santa Catarina, o último caso de raiva humana ocorreu em 1981, e os últimos registros de raiva urbana ocorreram em 2016, em um cão, no município de Jaborá, por envolvimento com morcegos. No entanto casos de raiva em animais de produção são registrados rotineiramente, na maioria das vezes associado à sugadura de morcegos infectados (DIRETORIA, 2012, 2018).

2.3 PATOGENIA

A infecção pelo vírus da raiva ocorre na maioria das vezes por transmissão percutânea, através da mordedura de animais infectados (RODRIGUEZ et al., 2007; BARROS et al., 2006; RADOSTITS et al., 2002), embora ocasionalmente possa ocorrer através da inalação de aerossóis em cavernas habitadas por morcegos contaminados (BARROS et al., 2006; JONES; HUNT; KING, 2000), ou exposição laboratorial acidental (ZACHARY, 2009). Há relato ainda da infecção em humanos após transplantes de órgãos (BURTON et al., 2005; SRINIVASAN et al., 2005; ZHOU et al., 2016).

O RABV causa doença relativamente lenta, mas progressiva. O período de incubação é altamente variável pois depende da concentração do vírus inoculado, local de inoculação e densidade de inervações (GREENE; RUPPRECHT, 2006). Em bovinos o período médio de incubação experimental é de 15 dias, enquanto nos equinos é de 12 dias e 10 dias para ovinos. Nos casos de ocorrência natural, em bovinos esse período é de em média três semanas, mas pode variar de duas semanas a vários meses (RADOSTITS et al., 2002).

O vírus de liga as células alvo (miócitos, neurônios motores e receptores locais) através dos receptores da proteína G e se multiplica nas células musculares e em macrófagos (TSIANG et al., 1986). Este se espalha a partir do local de replicação por transporte axonal retrógrado rápido via nervos periféricos para o corpo celular neuronal (WANG et al., 2013).

Se o vírus entrar diretamente nos terminais nervosos, provavelmente o período de incubação será menor, entretanto se houver uma infecção inicial nos miócitos, pode ocorrer à retenção do vírus, com demora na sua liberação e absorção pelos terminais nervosos, prolongando o tempo de incubação (ZACHARY, 2009).

Do cérebro, o vírus se espalha para as glândulas salivares e é excretado intermitentemente na saliva, e pode ser transmitido para outros hospedeiros. Após a disseminação centrípeta o vírus chega aos gânglios da raiz dorsal. Nos gânglios da raiz dorsal a replicação provoca inflamação e aí se tem o início dos sinais clínicos como paresia por exemplo (HEMACHUDHA et al., 2013).

2.4 SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos podem variar em função da localização das lesões no sistema nervoso e cursar com duas formas de apresentação: a furiosa ou a parálitica. A forma furiosa está relacionada a lesões cerebrais, e é mais frequente em caninos, enquanto a forma parálitica, normalmente está associada a lesões na medula e tronco encefálico sendo observada com maior frequência em herbívoros (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Os achados clínicos também podem ser variáveis dependendo da espécie (RADOSTITS et al., 2002), e de diferentes cepas virais (HEALY et al., 2013).

Diferenças na manifestação clínica para alguns autores não tem relação com a distribuição viral no SNC, com o grau de inflamação (TIRAWATNPONG et al., 1989) e nem com a taxa de replicação viral (APPOLINÁRIO et al., 2015). Em contrapartida outros já detectaram maiores níveis de RNA viral em amostras de cães com a forma furiosa em comparação aos animais com a forma parálitica (HEMACHUDHA et al., 2013).

Em bovinos no Brasil, predomina a forma clínica parálitica (BRASIL, 2009; BARROS et al., 2006). Os primeiros sinais são de incoordenação dos membros pélvicos, que evoluem para paralisia flácida, inicialmente de membros posteriores, após anteriores, seguida de decúbito esternal e lateral. Podem ser observados ainda: relaxamento de esfíncter anal, ausência de reflexo anal, paralisia de cauda, tremores de cabeça, opstótono, bruxismo, salivação, fezes ressequidas e escassas, retenção ou incontinência urinária (BARROS et al., 2006; LANGOHR et al., 2003; LIMA et al., 2005; RADOSTITS et al., 2002). Após o decúbito os animais não conseguem mais se levantar e a morte ocorre entre 3 a 6 dias após início dos sinais, eventualmente prolongando-se por até 10 dias (BRASIL, 2009).

A forma furiosa também pode ocorrer nos herbívoros (BRASIL, 2009; LANGOHR et al., 2003), e nesse caso o animal fica em estado de alerta, apresenta hiperexcitabilidade, mugidos constantes, agressividade, (RADOSTITS et al., 2002) e prurido intenso (BARROS et al., 2006; WISSER, 2014).

Uma vez iniciados os sinais, nada mais se pode fazer além de isolar o animal e esperar a sua morte, ou sacrificá-lo na fase agônica (BRASIL, 2009). Segundo o Conselho Federal de Medicina Veterinária:

A eutanásia deve ser indicada quando o bem-estar do animal estiver ameaçado, sendo meio de eliminar a dor, o distresse ou o sofrimento dos animais, os quais não podem ser aliviados por meio de analgésicos, de sedativos ou de outros tratamentos, ou, ainda, quando o animal constituir ameaça à saúde pública ou animal, ou for objeto de ensino ou pesquisa (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2002, p. 1).

Como os sinais clínicos podem ser confundidos com outras encefalites, e imprescindível que seja feito o diagnóstico laboratorial (BRASIL, 2009). Em bovinos devem ser incluídos outras enfermidades que cursam com quadro neurológico como: intoxicação por chumbo, polioencefalomalácia, listeriose (RADOSTITS et al., 2002; JONES; HUNT; KING, 2000; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007), botulismo, encefalite por herpes vírus-5 (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007), febre catarral maligna (BARROS et al., 2006).

2.5 LESÕES

Na Raiva não há lesões macroscópicas significativas (MAXIE; YOUSSEF, 2006), estas são microscópicas e limitadas ao SNC. Entretanto em alguns casos é observado hiperemia das leptomeninges, além de lesões secundárias ao comprometimento neurológico, como distensão da bexiga ou broncopneumonia por aspiração (BARROS et al., 2006).

O exame histopatológico do tecido cerebral infectado pode ser usado para identificar os corpúsculos de Negri no citoplasma neuronal, que são considerados característicos da infecção pelo vírus da raiva (JONES; HUNT; KING, 2000; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007; MAXIE; YOUSSELF, 2006). Esse são formados durante a transcrição primária, levando à produção de proteínas virais, caracterizando, portanto, o acúmulo de proteínas virais nos locais de síntese de RNA viral (LAHAYE et al., 2012)

Concomitante aos corpúsculos observam-se inflamação perivascular não supurativa, proliferação glial, degeneração e necrose neuronal (BECK et al., 2017; ZACHARY, 2009), além de ganglioneurite, e neurite nos nervos cranianos e espinhais (MAXIE; YOUSSELF,

2006). O infiltrado é predominantemente de linfócitos e em menor grau de macrófagos e plasmócitos (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

Observado pela primeira vez em 1903, por Adelchi Negri os corpúsculos por muitos anos foram o método mais rápido de diagnóstico para raiva (RODRIGUEZ et al., 2007; WOLDEHIWET, 2005). Entretanto deve se considerar a existência de pseudo-corpúsculos, que são corpúsculos inespecíficas no núcleo geniculado lateral e hipocampo de algumas espécies (MAXIE; YOUSSELF, 2006). Estima-se que em até 30% dos casos de raiva em bovinos, os corpúsculos não sejam visíveis nas colorações de rotina na histologia (BARROS et al., 2006; JONES; HUNT; KING, 2000), embora esses valores possam variar. Lima et al. (2005) observaram corpúsculos de inclusão em 87% dos bovinos, Langohr et al. (2003) observaram-nos em 68% dos encéfalos.

As regiões encefálicas mais frequentemente descritas com maior intensidade de lesões são o tronco encefálico, cerebelo e medula espinhal (LANGOHR et al., 2003). Lesões inflamatórias mais proeminentes nessas regiões podem ser relacionadas a característica da infecção viral, pois o vírus chega ao sistema nervoso central através de transporte axonal retrógrado (BECK et al., 2017; SWANEPOEL, 2004). A inflamação no tronco cerebral mais pronunciada poderia impedir a propagação viral para os hemisférios cerebrais (SHUANGSHOTI et al., 2013). O cerebelo em bovinos (LANGOHR et al., 2003; LIMA et al., 2005; SILVA et al., 2010) e o tálamo em caninos (BECK et al., 2017), são os locais mais indicados para visualização dos corpúsculos de Negri.

A intensidade das lesões é bastante variável (SUMMERS; CUMMINGS; DELAHUNTA, 1995). As alterações inflamatórias geralmente estão presentes, entretanto há casos que elas são leves ou estão até mesmo ausentes (MAXIE; YOUSSELF, 2006). A severidade das lesões teoricamente aumenta com a progressão da doença. Langhor et al. (2004), observaram os corpúsculos de Negri e o infiltrado inflamatório perivascular mais frequente e marcante em animais que sobreviveram por mais de 4 dias após o início dos sinais clínicos. Além disso, a maioria dos neurônios com corpúsculos eram vistas em áreas com pouca reação inflamatória. A avaliação histológica é essencial pois além de auxiliar na visualização das lesões de raiva pode auxiliar a definir os diagnósticos diferenciais dos casos negativos para raiva (BECK et al., 2017).

2.6 DIAGNÓSTICO DE RAIVA

O diagnóstico clínico de raiva é difícil, sendo muitas vezes realizado após a morte do animal. Na necropsia, a raiva geralmente é diagnosticada sujeitando porções de tecido nervoso fixado em formol ou fresco ao exame patológico e ao diagnóstico de rotina (BEIGH et al., 2015). Segundo a recomendação da OIE deve ser realizado o teste de IFD no tecido cerebral, se este for negativo deve ser confirmado pelo ensaio biológico com o teste de inoculação em camundongo (MIT) (WORLD, 2013).

A IFD é considerada o teste padrão ouro, devido a sua alta sensibilidade e especificidade, além da rapidez na execução (WORLD, 2013; RODRIGUEZ et al., 2007; JONES; HUNT; KING, 2000). Utilizada pela primeira vez em 1958, em 1970 passou a ser um método de rotina (WOLDEHIWET, 2005).

Algumas vezes casos de raiva podem ser negativos na prova de IFD (FERREIRA et al., 2012; LANGOHR et al., 2003; BASSUINO et al., 2016). Vários fatores influenciam na acurácia desse diagnóstico, entre eles: baixa titulação viral (SILVA et al., 2010), conhecimento do examinador, material base utilizado e qualidade do conjugado antirrábico (WORLD, 2013), além de reações individuais, bem como o estado de conservação das amostras (GERMANO et al., 1977). Além disso é recomendado o envio de amostras de tronco cerebral e cerebelo para a realização do teste (WORLD, 2013). Contudo valores entre 95-99% estão dentro dos valores de confiabilidade previstos quando realizada em amostras frescas (BRASIL, 2009).

O isolamento viral através de inoculação em camundongo embora seja altamente sensível, confiável e de fácil execução, necessita de um longo tempo para a obtenção dos resultados, cerca de 21 a 30 dias, além de questões relacionadas ao uso de animais (KANITZ et al., 2015). O isolamento em cultura de células de neuroblastoma é tão eficiente quanto à inoculação em animais, com a vantagem de diminuir o tempo necessário para o diagnóstico para 1-2 dias (WORLD, 2013). Alternativamente ainda podem ser utilizados células de neuroblastoma murino e células de rim de hamster, com bons resultados (KANITZ et al., 2015).

A IHQ é outra técnica que pode ser utilizada rotineiramente no diagnóstico de raiva. A IHQ fornece uma abordagem alternativa quando o padrão ouro não é viável ou quando histopatológico convencional e a técnica de anticorpos imunofluorescentes não conseguiram detectar lesões ou antígeno viral (BEIGH et al., 2015). A IHQ melhora a precisão diagnóstica e a visualização do antígeno. Outra vantagem da IHQ é a inativação rápida do vírus, assim o transporte e processamento das amostras é mais seguro (SHARMA et al., 2014). Além disso, devemos considerar sua importância para o diagnóstico nos casos onde não são observados

corpúsculos e principalmente nas espécies em que elas são menos frequentes ou estão ausentes (ACHKAR et al., 2010). No entanto deve se ter cuidado quanto ao tempo de fixação da amostra, já que fixações prolongadas podem gerar marcações fracas ou ausentes (FAIZZE et al., 2012).

Na medicina humana a imunohistoquímica, tem sido aplicada no diagnóstico *ante-mortem* de raiva, através da identificação do vírus em biopsia de pele (BAGÓ; REVILLA-FERNANDEZ; ALLERBERGER, 2005). Em animais, diversos estudos têm demonstrado à alta sensibilidade da técnica no diagnóstico de raiva *post mortem* (PEDROSO et al., 2008; ACHKAR et al., 2010). Outros autores ainda descrevem técnicas de fixação em microondas com o intuito de reduzir o tempo de fixação das amostras, obtendo assim o diagnóstico através da IHQ mais rápido (ABREU et al., 2012).

A imuno-histoquímica direta ou imunocitoquímica é outra técnica descrita, que consiste na aplicação de imunohistoquímica sobre esfregaço ou imprint de sistema nervoso de animais suspeitos de Raiva. Diversos trabalhos têm demonstrado sua alta sensibilidade e especificidade, sendo comparáveis a imunofluorescência direta (MADHUSUDANA et al., 2012; LEMBO et al., 2006).

Existem ainda os métodos moleculares como a RT-PCR, utilizado no diagnóstico *ante mortem* em humanos, através da identificação do vírus na saliva e líquido cefalorraquidiano (NAGARAJ et al., 2006). Além disso a técnica permite fazer a discriminação de diferentes estirpes de RABV através de sequenciamento, ou no qRT-PCR determinar a quantificação do RNA viral (CARNIELI et al., 2006).

A capacidade da RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) para quantificar com precisão cargas virais (quantidades de RNA viral) em amostras é de grande importância para estudos de patogenicidade e proliferação de vírus. Além disso, este ensaio quantitativo pode substituir ou fornecer uma alternativa às titulações convencionais. Os métodos genômicos prometem ser transformadores para a prática clínica se tornando uma tecnologia viável em laboratórios de diagnóstico e referência em um futuro próximo (SILVA et al., 2013).

O estudo histológico das amostras suspeitas de raiva, através da visualização dos corpúsculos de Negri, permite complementar o diagnóstico de raiva (SILVA et al., 2010; BEIGH et al., 2015). Descrito em 1903, por Adelchi Negri os corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos em neurônios, por muitos anos foram o método mais rápido no diagnóstico da raiva (WOLDEHIWET, 2005). Contudo a regularidade com que os corpúsculos são observadas variam: Lima et al., (2005), observaram em 87% dos casos, Silva et al., (2010) e Langohr et al. (2003), em 68% dos casos.

Acredita-se que vários fatores podem influenciar nas lesões histológicas de Raiva em bovinos. Para o corpúsculo de Negri, por exemplo, o estágio e curso da doença, além da cepa e concentração do vírus são determinantes no seu aparecimento (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Segundo Summers, Cummings, Delahunta (1995) o sacrifício de animais infectados pode resultar em casos com ausência de corpúsculos de Negri. Entretanto o diagnóstico precoce da raiva em animais é necessário para a administração adequada de profilaxia pós-exposição (BEIGH et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a influência da evolução clínica da doença, da linhagem genética e carga viral no diagnóstico de Raiva em bovinos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) avaliar a eficácia do diagnóstico laboratorial de raiva bovina nos diferentes estágios de evolução da doença;
- b) avaliar a influência da evolução clínica, carga viral e linhagem genética do vírus da raiva na intensidade de lesões histológicas.

4 ARTIGO CIENTÍFICO I: EFICÁCIA DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA RAIVA BOVINA NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE EVOLUÇÃO DA DOENÇA

4.1 RESUMO

Este trabalho relata a utilização de diferentes testes de diagnóstico de raiva em 34 bovinos, naturalmente infectados pelo *Rabies lyssavirus* (RABV), eutanasiados desde estágios iniciais da doença até a morte espontânea. Além disso discute a importância da eutanásia em estágios precoces da doença como forma de melhorar o bem-estar animal e minimizar os riscos de contágio aos humanos. Para isso foram coletadas amostras de 34 encéfalos de bovinos com quadro sugestivo de raiva, mortos naturalmente ou eutanasiados para exame. Os bovinos foram divididos em quatro grupos: G1: animais eutanasiados em estação, G2: eutanasiados em decúbito esternal, G3: eutanasiados em decúbito lateral e G4: morte espontânea. As amostras foram submetidas aos testes de imunofluorescência direta (IFD), histopatologia com coloração de hematoxilina e eosina (HE), imuno-histoquímica (IHQ) e esfregaço direto com Shorr. As amostras que obtiveram resultado divergente nas técnicas padrão de IFD e IHQ foram ainda submetidas ao isolamento viral em cultivo de células (IVCC). Todas as técnicas de diagnóstico apresentaram casos positivos em todos os grupos analisados. Cada caso foi positivo em pelo menos dois métodos de diagnóstico, independente do estágio evolutivo da doença. A IHQ foi positiva em 100% dos casos, seguido pela IFD em 97%, HE 91% de positivos e Shorr 79%. Todos os casos que continham Corpúsculos de Negri foram positivos para raiva nos demais testes.

Palavras chaves: Raiva bovina, Diagnóstico laboratorial, Eutanásia.

4.2 ABSTRACT

This work reports the use of different diagnostic tests for rabies in 34 cattle, naturally infected by *Rabies lyssavirus* (RABV), euthanized in different evolution stages or naturally dead by de disease. It also discusses the importance of euthanasia in the early stages of disease to improve animal welfare and minimize the risk of human contagion. For this, samples of 34 bovine brains were collected, suggestive of rabies, naturally dead or euthanized for examination. The cattle were divided into four groups: G1: animals euthanized in standing; G2: euthanized in sternal decubitus; G3: euthanized in lateral decubitus; and G4: spontaneous death. Samples were submitted to direct immunofluorescence tests (DFI), histopathology with hematoxylin and eosin staining (HE), immunohistochemistry (IHC) and direct smear with Shorr. Samples that obtained divergent results in the standard techniques of DFI and IHC were also subjected to virus isolation in cell culture (VICC). All diagnostic tests presented positive cases in all groups analyzed. Each case was positive in at least two diagnostic methods, regardless of the evolutionary stage of the disease. IHC was positive in 100% of cases, followed by DFI with 97%, HE with 91% and Shorr with 79%. All cases containing Negri bodies were positive for rabies in the remaining tests.

Keywords: bovine rabies, laboratory diagnostic, euthanasia

4.3 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa, de notificação obrigatória, causada pelo RABV (*Rabies lyssavirus*), um RNA vírus do gênero *Lyssavirus* que acomete o Sistema Nervoso Central (SNC) de diferentes espécies. Esta doença quase 100% fatal atinge inclusive o homem, sendo uma zoonose de ampla distribuição (FAIZEE et al., 2012; BEIGH et al., 2015; Buchen-Osmond, 2003).

A imunofluorescência direta (IFD) é o teste padrão ouro para o diagnóstico da raiva (WORLD, 2013), mas este pode ser realizado por outras técnicas laboratoriais como: isolamento viral, realizado em cultura celular (IVCC) ou através da inoculação intracerebral em camundongos (*Mouse intracerebral test- MIT*) (RODRIGUEZ et al., 2007); diagnóstico histológico, através da visualização de corpúsculos de Negri em colorações histoquímicas de hematoxilina e eosina (SHARMA et al., 2014) e de Selller's (TEKKI et al., 2016) ou através da imuno-histoquímica (PEDROSO et al., 2008) e imuno-histoquímica direta, sendo esta última utilizadas com sensibilidade e especificidade comparáveis a IFD (LEMBO et al., 2006; WORLD, 2013).

Apesar do diagnóstico laboratorial de raiva estar bem estabelecido, através da utilização das técnicas descritas anteriormente, a relação da detecção do vírus com a evolução clínica da doença precisa ser melhor elucidada. A severidade das lesões teoricamente aumenta com a progressão da doença, entretanto não se sabe se as chances de se estabelecer um diagnóstico laboratorial são maiores em animais mortos naturalmente ou eutanasiados para exame (SWANEPOEL, 2004). Diversos estudos comparam a sensibilidade e especificidade das técnicas de diagnóstico (HANANEH et al., 2015; FAIZEE et al., 2012), contudo estes não contemplam a influência da eutanásia nos resultados dos testes.

A suposição que as alterações patológicas da raiva sejam mais facilmente observadas quando os tecidos são colhidos após a morte espontânea do animal, bem como a não evidenciação das lesões e corpúsculos de Negri no caso de sacrifício em estágios precoces da enfermidade, fez com que a eutanásia dos animais suspeitos de raiva venha sendo evitada, optando-se por coletar amostras para diagnóstico somente após a morte natural.

Optar por manter vivo o animal suspeito de raiva até a sua morte espontânea, para coleta de material, implica em submetê-lo à fome e sede de forma desnecessária, visto que o estágio terminal da doença se caracteriza por paralisia flácida com incapacidade de deglutição, situação contrária aos preceitos de bem estar animal que vem sendo preconizados de forma crescente. Além disso, a permanência de animais doentes aumenta as chances de contágio aos humanos ocupacionalmente expostos ao vírus. A partir de tais considerações o presente estudo traz

informações sobre a detecção do RABV em diferentes testes diagnósticos em 34 bovinos, naturalmente infectados e eutanasiados em diferentes estágios clínicos da doença.

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de encéfalos (córtex, cerebelo e hipocampo) e medula espinhal foram obtidas durante o acompanhamento de surtos epidemiológicos de raiva bovina, no Estado de Santa Catarina, região sul do Brasil. Após o primeiro diagnóstico positivo de raiva, realizado por imuno-histoquímica (IHQ) ou imunofluorescência direta (IFD), os demais animais envolvidos que desenvolveram quadro clínico compatível, no mesmo período, foram eutanasiados em estágios mais precoces da doença para fins de diagnóstico. Conforme os estágios evolutivos da doença foram criados 4 grupos de análise: Grupo 1 - animais em pé com capacidade de locomoção e sinais leves de incoordenação motora. Grupo 2: eutanasiado em decúbito esternal; Grupo 3 - eutanasiado em decúbito lateral e Grupo 4- animal com morte espontânea.

Fragmentos de sistema nervoso central (SNC) e medula espinhal foram coletadas e conservadas em formol tamponado 10% e sob refrigeração e posteriormente congeladas. As amostras conservadas em formol foram submetidas à histopatologia com colorações de Hematoxilina e Eosina (HE) e IHQ, de acordo com o protocolo adaptado de Pedroso et al. (2008), utilizando o anticorpo policlonal anti-rabies polyclonal Chemicon #5199. As amostras congeladas, foram submetidas aos testes de esfregaço direto corado com Shorr e IFD. Para tais testes foram realizados em duplicata esfregaços em lâminas histológicas de cada fragmento coletado. Uma lâmina de cada esfregaço foi corada com Corante de Shorr (Tricrômico de Shorr – Biotec Reagentes Analíticos/Labmaster Ltda) e as amostras foram analisadas para presença ou ausência de corpúsculo de Negri. A outra lâmina de cada esfregaço foi fixada em acetona e submetida à IFD, realizada de acordo com a técnica descrita por Dean et al. (1996), com conjugado antirrábico policlonal antinucleocapsídeo, produzido no Instituto Pasteur de São Paulo/SP. As amostras que obtiveram resultado divergente nas técnicas padrão de IFD e IHQ foram ainda submetidas ao isolamento viral em cultivo de células (IVCC) em células de neoblastoma de murinho (N2A) realizado conforme descrito por Castilho et al. (2007).

4.5 RESULTADOS

Foram acompanhados surtos de raiva bovina, em 9 municípios, localizados nas regiões Leste, Vale e Sul do Estado de Santa Catarina, região sul do Brasil, entre os anos de 2011 e

2016. A idade dos animais afetados variou de 4 meses a 13 anos. Nenhum bovino havia recebido vacina antirrábica, ou tinham sido vacinados até 15 dias antes do desenvolvimento dos sinais clínicos.

Um total de 34 encéfalos foram avaliados, sendo, seis amostras para os grupos G1 e G2 cada, 18 para o G3 e quatro para G4. A IHQ foi positiva em 100% dos casos, independente da morte natural ou eutanásia. A IFD foi positiva em 97,05% dos casos, sendo esta técnica negativa somente em um bovino eutanasiado em estágio precoce da doença (G1), contudo, a presença de RABV nesta amostra foi confirmada por IVCC. A histologia com HE, através da visualização das inclusões de Negri, foi positiva em 91% dos casos, e o teste de análise microscópica direta com corante de Shorr, foi positivo em 79% deles. Todos os casos que continham Corpúsculos de Negri foram positivos para raiva nos demais testes. Todas as técnicas de diagnóstico apresentaram casos positivos em todos os grupos analisados. Cada caso foi positivo em pelo menos dois métodos de diagnóstico, independente do estágio evolutivo da doença. Os dados relativos ao número de casos positivos para cada teste, nos diferentes estágios clínicos da doença, podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1 - Número de casos positivos e porcentagem para cada teste de diagnóstico nos diferentes grupos de análise.

GRUPO	N. DE ANIMAIS TESTADOS	NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS POR TESTE							
		IHQ		IFD		H&E com C. Negri		Citologia com Shorr	
		+	%	+	%	+	%	+	%
G1	6	6	100	5	80	4	66	4	66
G2	6	6	100	6	100	5	83	5	80
G3	18	18	100	18	100	18	100	14	77
G4	4	4	100	4	100	4	100	4	100
TOTAL	34	34	100	33	97,05	31	91,17	27	79,41

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

G1: Bovino em estação; G2: Decúbito esternal; G3: Decúbito lateral; G4: Morte espontânea. IHQ: imunohistoquímica; IFD: imunofluorescência direta; (+) positivo; (%) percentagem.

4.6 DISCUSSÃO

Diversos fatores podem influenciar a acurácia do diagnóstico de raiva, entre eles: baixa titulação viral (SILVA et al., 2010), conhecimento do examinador, material base utilizado, qualidade do conjugado antirrábico (WORLD, 2013), reações individuais, bem como o estado

de conservação das amostras (GERMANO et al., 1977). Esse trabalho limitou-se a estudar a influência da evolução clínica da doença sobre os testes de diagnóstico.

Nas amostras avaliadas observou-se que a IFD foi positiva em 97% dos casos, com apenas um (caso negativo). Valores entre 95-99% estão entre os previstos para o diagnóstico laboratorial através de IFD quando realizado em amostras frescas (BRASIL, 2009). O resultado falso negativo de IFD pertenceu ao Grupo1 (animais eutanasiados em estação) e sobre a influência da evolução clínica nesse fato faz-se necessário tecer três considerações: Primeira, a ocorrência de falsos negativos de IFD também são relatados em outros trabalhos realizados avaliando técnicas de diagnóstico de animais, com morte espontânea ou eutanasiados *in extremis* (BASSUINO et al., 2016; FERREIRA et al., 2012; LANGOHR et al., 2003). Segunda, a amostra negativa na IFD, teve a presença do vírus confirmada por IVCC, além disso tal amostra foi positiva em todos os demais testes, logo, o vírus estava presente no encéfalo em quantidades necessárias de ser detectável para diagnóstico. Terceiro ponto a ser considerado é que os grupos G2 e G3, onde os animais também foram eutanasiados para diagnóstico, as técnicas (IHQ e IFD) apresentaram 100% de eficácia, sugerindo que a eutanásia não interferiu o diagnóstico através da IFD no caso negativo, assim como não o fez nos demais 29 caso positivos eutanasiados e da mesma maneira que não prejudicou a acurácia do diagnóstico da IHQ.

As IHQ demonstrou-se eficiente em todas as amostras. Independente da morte natural ou eutanásia esta foi 100% efetiva. Amplamente usada na rotina laboratorial a IHQ é uma alternativa importante quando o padrão ouro não é viável ou o histopatológico convencional com HE e a IFD não conseguem detectar lesões ou o antígeno viral (BEIGH et al., 2015). A presença do vírus através da IHQ pôde ser constatada desde o início da doença clínica, fato constatado também por Healy et al. (2013). A IHQ melhora a precisão diagnóstica e a visualização do antígeno, além de ter como vantagem também a inativação rápida do vírus durante a coleta, tornando o transporte e processamento mais seguros (SHARMA et al., 2014).

É sabido que os corpúsculos de Negri observados pela histopatologia nas colorações histoquímicas de HE, Sellers e Shorr, são patognomônicos da raiva, contudo a regularidade com que as inclusões são observadas variam, podendo ocasionar falso negativos. Nesta pesquisa esses foram visíveis em 91% dos casos corados em HE, número maior do que o encontrado por Lima et al. (2005), de 87%, e de Silva et al. (2010) e Langohr et al. (2003), ambos com 68% dos casos. Segundo Summers, Cummings e Delahunta (1995) o sacrifício de animais infectados pode resultar em casos com ausência de corpúsculos de Negri. Os dados avaliados demonstram a presença de corpúsculos de inclusão de Negri em todos os grupos avaliados. Contudo animais

eutanasiados em estágios mais precoces demonstraram menor percentual do que os mortos naturalmente ou eutanasiados *in extremis*.

Quando se trata da citologia com Shorr os dados avaliados demonstram que esta técnica foi positiva em 79% dos casos de raiva com valores variáveis entre os grupos. A visualização dos corpúsculos de Negri, quer seja realizada por histologia com colorações de HE ou com citologia através de esfregaço de SNC, apresentem baixa sensibilidade se comparado a IFD e IHQ. A sensibilidade menor de técnicas de citologia por exemplo com coloração de Seller's, já havia sido mencionada anteriormente (TEKKI et al., 2016) Contudo cabe ressaltar que a especificidade destas é de 100% e, dessa maneira, poderia auxiliar como um teste rápido para triagem, embora os resultados negativos devam ser reavaliados por IFD ou IHQ. Nesse estudo, todos os casos em que foram visualizadas as inclusões no esfregaço de Shorr, resultaram em positivos para raiva nos demais testes; inclusive naquele em que a IFD foi negativa para raiva.

A visualização do corpúsculo de Negri através da coloração de Shorr em esfregaço ou em histologia pode direcionar o diagnóstico e auxiliar nas medidas de prevenção e controle, até que o resultado do método oficiais seja concluído. No Laboratório de patologia animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, todo o exame positivo no Shorr é encaminhado à Secretaria de Saúde Pública do Estado para o encaminhamento necessário. Entende-se que este procedimento agiliza as medidas de controle preventiva para humanos antes que a prova de IFD seja realizada nos Laboratórios oficiais de outros Estados da Federação. Considera-se essa uma medida eficaz e importante, principalmente em países continentais como o nosso, onde às vezes as amostras precisam percorrer longos caminhos, o que retarda as medidas de controle da doença.

Em 1903, Adelchi Negri descreveu os corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos em neurônios, que por muitos anos foram o método mais rápido no diagnóstico da raiva (WOLDEHIWET, 2005). A imunofluorescência direta (IFD) foi utilizada pela primeira vez em 1958, mas somente em 1970, passou a ser um método de rotina (WOLDEHIWET, 2005). De 1903 a 1970 o método de diagnóstico baseava-se exclusivamente na visualização de Corpúsculo de Negri que, como discutido anteriormente, não é observado em todos os casos da doença. Desse ponto de vista é provável que a presença ou, principalmente, a ausência destes tenha contribuído para hipótese de que a eutanásia prejudique o diagnóstico.

De 1903 até os dias atuais passaram-se mais de 100 anos e surgiram melhorias significativas de equipamentos e técnicas de laboratório. Além da IFD, tem-se hoje a Reação de polimerase em cadeia, a IHQ e a IHQ direta que independem da presença do corpúsculo Negri na histologia para a positividade do teste. Contudo continua-se acreditando no conceito,

elaborado no século passado, de que a eutanásia do animal seja capaz de interferir também nas modernas técnicas de diagnóstico.

Salienta-se que se deve ter cautela e bom senso no diagnóstico de raiva, pois a observação clínica de bovinos com quadro neurológico permite apenas suspeitar que um animal esteja infectado pelo vírus da raiva e que a eutanásia precoce deve ser realizada somente após o primeiro caso positivo do surto identificado por confirmação laboratorial. Destaca-se, também, que a associação entre técnicas de diagnóstico de raiva é a melhor opção quando se opta pela eutanásia do animal em estágios precoces da doença. Considerando-se que mais de 70.000 pessoas morrem anualmente no mundo em decorrência da raiva (OIE, 2018), é necessário que o diagnóstico desta doença seja realizado de maneira rápida e segura, para que medidas de controle efetivas sejam tomadas rapidamente, evitando prejuízo econômicos e a ocorrência de epizootias, assegurando o bem-estar animal e principalmente garantindo que os humanos fiquem o menor tempo em contato com os animais doentes, minimizando o risco de contágio.

4.7 REFERÊNCIAS

BASSUINO, D. M. et al. Characterization of spinal cord lesions in cattle and horses with rabies: the importance of correct sampling. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [California], v. 28. 4. ed. p.455-460, jul. 2016

BEIGH, A. B. et al. Comparative evaluation of clinicopathological, immunohistochemical, and immunofluorescent techniques for diagnosis of rabies in animals. **Comparative Clinical Pathology**, [Nova Iorque], v. 24, p. 1177–1184, jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Controle de Raiva em Herbívoros: manual técnico 2009**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 124p.

BUCHEN-OSMOND, C. The Universal Virus Database ICTVDB. **Computing in Science & Engineering**, [Washington], v. 5, p. 16-25, maio/jun. 2003.

CASTILHO, J.G. et al. Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A). **Boletim Epidemiológico Paulista**. [São Paulo], v. 4, n. 47, p.12-18, nov. 2007.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: Meslin, F. X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, H. (Eds), **Laboratory Techniques in Rabies**. v. 1. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 88-93.

FAIZEE, N. et al. Pathological, Immunological and Molecular Diagnosis of Rabies in Clinically Suspected Animals of Different Species Using Four Detection Techniques in Jordan. **Transboundary and Emerging Diseases**, [Hoboken], v. 59, n. 2, p. 154-164, abr. 2012.

FERREIRA, R. S. et al. Bovine rabies incidence in the state of Minas Gerais/Brazil, between 2002 and 2006. **Arquivos do Instituto Biológico**, [São Paulo], v. 79, n. 2, p. 287-291, abr./jun. 2012.

GERMANO, P. M. L. et al. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos, aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária**, [São Paulo] v. 14, n. 1, p. 133-141, 1977.

HANANEH W. M. et al. Pathological and molecular diagnosis of rabies in clinically suspected food animals using different diagnostic tests. **Large Animal Review**, [Cremona] v. 21, n. 6, p. 243-250, 2015.

HEALY, D. M. et al. Pathobiology of rabies virus and the European bat lyssaviruses in experimentally infected mice. **Virus Research**, [Amsterdã], v. 172, n. 1/2, p. 46-53, mar. 2013.

LANGOHR, I. M. et al. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. **Ciência Rural**, [Santa Maria], v. 33, n. 1, p. 125-131, jan./fev. 2003.

LEMBO, T. et al. Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. **Emerging Infectious Disease**, [Atlanta], v. 12, n. 2, p. 310-313, fev. 2006.

LIMA, E. F. et al. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [Seropédica], v. 25, n. 4, p. 250-264, oct./dec. 2005.

OIE, 2018. Disponível em: <www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/rabies-portal>. Acesso em: 16 maio 2018.

PEDROSO, P. M. O. et al. Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [Seropédica], v. 28, n. 12, p. 627-632, dez. 2008.

RODRIGUEZ, L. L. et al. **Virologia Veterinaria**, 1. ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. 888 p.

SHARMA, P. et al. Diagnosis of rabies from brain: Comparison of histochemical and histopathological approaches. **Indian Journal of Veterinary Pathology**, [Mathura], v. 38, n. 4, p. 269-272, jan. 2014.

SILVA, M. L. C. R. et al. Distribuição do vírus rábico no sistema nervoso central em ruminantes naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [Seropédica], v. 30, n. 11, p. 940-944, nov. 2010.

SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J.; DELAHUNTA, A. **Veterinary neuropathology**. 1. ed. Saint Louis: Mosby, 1995. 527 p.

SWANEPOEL, R. Rabies. In: COETZAR, J. A. W.; TUSTIN, R. C. (Eds), **Infectious Disease of Livestock**. v. 2, 2.ed. Reino Unido: Oxford University Press, 2004.

TEKKI, I. S. et al. Comparative assessment of seller's staining test (SST) and direct fluorescent antibody test for rapid and accurate laboratory diagnosis of rabies. *African Health Sciences*, [Uganda], v. 16, n. 1, p. 123-127, mar. 2016.

WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. **Clinica Chimica Acta**. [Nova Iorque], v. 351, n. 1-2, p. 49-63, jan. 2005.

WORLD Health Organization. Who Expert Consultation on Rabies. Genebra: World Health Organization. 2013. Disponível em:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85346/1/9789241209823_eng.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2014.

5 ARTIGO CIENTÍFICO II: INFLUÊNCIA DA EVOLUÇÃO CLÍNICA, CARGA VIRAL E LINHAGEM GENÉTICA DO VIRUS DA RAIVA NA INTENSIDADE DE LESÕES HISTOLÓGICAS

5.1. RESUMO

Esse estudo buscou avaliar se a evolução clínica com morte natural ou eutanásia, bem como a linhagem genética viral e a carga viral podem influenciar no surgimento e intensidade das lesões histológicas. Para isso bovinos infectados naturalmente pelo vírus da raiva foram acompanhados clinicamente e coletadas amostras durante a necropsia. Conforme o estágio evolutivo da doença foram agrupados em: G1- animal eutanasiado em estação, G2: eutanasiado em decúbito esternal. G3- eutanasiado em decúbito lateral G4- animal com morte espontânea. Amostras de encéfalo, medula espinhal e gânglio trigêmeo foram coletadas e submetidas a IFD, IHQ, Histopatologia com coloração de H.E, RT-PCR e qRT-PCR. Para avaliação da intensidade de lesão e presença de inclusões de Negri o encéfalo foi clivado em 9 porções, além de medula espinhal e gânglio trigêmeo. A intensidade de lesões foi graduada como ausentes, leve, moderado e acentuado e os corpúsculos de Negri em presentes ou ausentes. As lesões histológicas foram caracterizadas por meningoencefalite linfocítica e macrofágica associadas a Corpúsculo de inclusões de Negri em 28 casos. Em todos os grupos analisados observaram-se intensidades de lesões histológicas que variaram de leve a acentuado. As regiões encefálicas com maior intensidade de lesão inflamatória foram o óbex seguido pelo colículo e tálamo. Os corpúsculos de Negri foram observados em maior porcentagem no cerebelo, seguido pelo óbex, complexo estriado e córtex frontal. A evolução clínica da doença não influenciou na intensidade de lesão inflamatória, mas influenciou a presença dos corpúsculos de Negri. Todas as amostras RABV isoladas incluídas no presente estudo apresentam linhagem genética característica de morcegos hematófagos *D. rotundus*. Das 31 amostras coletadas 9 amplificaram, sendo que a quantidade de vírus não teve relação com a média da intensidade de lesão, a evolução clínica da doença e presença do corpúsculo de Negri.

Palavras chave: Zoonose, Encefalite viral, Histologia.

5.2 ABSTRACT

This study aimed to evaluate whether the clinical evolution with natural death or euthanasia, as well as viral genetic lineage and viral load can influence the appearance and intensity of histological lesions. For this, cattle naturally infected by the rabies virus were accompanied clinically and samples were taken during necropsy. According to the evolutionary stage of the disease were grouped in: G1- animal euthanized in standing, G2: euthanized in sternal decubitus. G3- euthanized in lateral position G4- animal with spontaneous death. Samples of brain, spinal cord and trigeminal ganglion were collected and submitted to DIF, IHC, Histopathology with H.E staining, RT-PCR and qRT-PCR. For evaluation of the lesion intensity and presence of Negri bodies the brain was cleaved in 9 parts, in addition to spinal cord and trigeminal ganglion. The intensity of the lesions was graded as absent, mild, moderate and accentuated and the Negri bodies in present or absent. Histological lesions were characterized by lymphocytic and macrophagic meningoencephalitis associated with Negri bodies in 28 cases. In all groups analyzed, intensities of histological lesions were observed

ranging from mild to severe. The encephalic regions with the highest inflammatory lesion intensity were the obex, followed by the colliculus and thalamus. The Negri bodies were observed in a higher percentage in the cerebellum, followed by the obex, corpus striatum and frontal cortex. The clinical evolution of the disease did not influence the intensity of the inflammatory lesion, but it influenced the presence of the Negri bodies. All the isolated RABV samples included in the present study present a genetic lineage characteristic of hematophagous bats *D. rotundus*. Of the 31 samples collected, 9 amplified, and the amount of virus had no relation to the mean of the lesion intensity, the clinical evolution of the disease and the presence of the Negri bodies.

Keywords: zoonosis, viral encephalitis, histology.

5.3 INTRODUÇÃO

A raiva é uma das zoonoses de maior importância em saúde pública por sua evolução letal bem como elevado custo social e econômico (BRASIL, 2009). No sul do Brasil um estudo avaliando um período de 36 anos, demonstrou que a doença foi responsável por 49,51% dos casos de doença neurológicas em bovinos (SANCHES et al., 2000).

O diagnóstico de raiva deve ser laboratorial, pois os sinais clínicos não são característicos e podem variar entre indivíduos (BRASIL, 2009). Embora o diagnóstico oficial seja dado pela imunofluorescência direta e inoculação intracraniana em camundongo (WHO 2013), diversas técnicas são utilizadas na rotina laboratorial (PEDROSO et al., 2008; TEKKE et al., 2016, SHARMA et al., 2014; SILVA et al., 2013);

O exame histopatológico do tecido cerebral infectado pode ser usado para identificar as inclusões de Negri no citoplasma neuronal, que é considerado patognomônicos, concomitante a inflamação perivascular não supurativa, proliferação glial, degeneração e necrose neuronal (BECK et al., 2017). Contudo a intensidade destas é bastante variável (SUMMERS; CUMMINGS; DELAHUNTA, 1995) e a severidade das lesões teoricamente aumenta com a progressão da doença (LANGOHR et al., 2003). Sendo frequentemente lesões mais graves relacionadas a curso clínico mais prolongado (LANGOHR et al., 2003; LIMA et al., 2005).

Acredita-se que vários fatores podem influenciar nas lesões histológicas, entre eles a cepa e concentração do vírus (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007), além do período de incubação e evolução, com o sacrifício precoce, o estado de conservação das amostras e reações individuais a doença (GERMANO et al., 1977).

Com base nisso este estudo buscou avaliar se a eutanásia em estágios precoces bem como, a linhagem genética e a concentração do RABV podem influenciar na intensidade das lesões inflamatórias e presença de inclusão de Negri, em bovinos infectados naturalmente pelo vírus da Raiva.

5.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Trinta e uma amostras de encéfalos foram obtidas através de acompanhamento clínico de bovinos com raiva no Estado de Santa Catarina. Após o primeiro diagnóstico positivo de Raiva da propriedade, realizado por IHQ ou IFD, os demais animais da propriedade que desenvolveram quadro clínico compatível com Raiva, no mesmo período, foram sacrificados em estágios precoces sendo subdivididos em quatro grupos: Grupo1- “Animal eutanasiado em estação”, Grupo 2: “Animal eutanasiado em decúbito esternal”. Grupo3- “Animal eutanasiado em decúbito lateral” Grupo 4- “Animal com morte espontânea”.

Amostras de sistema nervoso central, medula espinhal cervical e gânglio trigeminal foram coletadas para realização de histopatologia com coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), imunofluorescência direta (IFD), imuno-histoquímica (IHQ), reação em cadeia de polimerase para caracterização genética (RT-PCR) e reação em cadeia de polimerase quantitativo (qT-PCR) para determinar a carga viral.

5.4.1 Histopatologia, IHQ e IFD

Para o exame histopatológico as amostras coletadas em formalina tamponada 10% foram clivadas nas seguintes porções: Gânglio trigêmeo, óbex, cerebelo, colículo, córtex frontal, complexo estriado, telencéfalo parietal, tálamo, telencéfalo occipital, hipocampo e medula espinhal. Os cortes, após processados (fixados em formalina tamponada, clivados, incluídos em blocos de parafina, cortados no micrótomo com 5 micras e esticados em lâmina de vidro), foram corados com hematoxilina e eosina e avaliados quanto à intensidade das lesões inflamatórias em: (0) sem alterações, (1) inflamação leve com até duas camadas de células inflamatórias perivascular e gliose leve, (2) inflamação moderada com 3-4 camadas de células inflamatórias perivascular e gliose moderada, (3) inflamação acentuada com 3-4 camadas de células inflamatórias perivascular e gliose acentuada ou mais de 4 camadas de células inflamatórias perivascular e também a presença de inclusões de Negri em cada região.

A IHQ foi aplicada nas amostras segundo protocolo adaptado de Pedroso et al. (2008), utilizando o anticorpo policlonal anti-rabies polyclonal Chemicon #5199. A IFD direta foi realizada de acordo com a técnica descrita por Dean et al. (1996), pelo uso de conjugado antirrábico policlonal antinucleocapsídeo, produzido no Instituto Pasteur de São Paulo.

5.4.2 Detecção e caracterização molecular e quantificação do vírus da Raiva

A caracterização molecular foi realizada através de RT-PCR seguida de sequenciamento genético. Foi utilizado um pool contendo amostras de cerebelo, tronco encefálico e córtex. Do qual foi extraído o RNA total de cada uma das amostras utilizando *TRIzol Reagent* (Invitrogen™). Para a transcrição reversa foi utilizado 5 µl do RNA extraído de cada amostra, os *primers* 21G (senso) (5' ATGTAACACCTCTACAATG 3') e 304 (antisenso) (5' TTDACGAAGATCTTGCTCAT 3') direcionados ao gene da nucleoproteína do RABV e o *kit Superscript™ II Reverse Transcriptase* (Invitrogen™). Para a PCR foram utilizados os *primers* 21G e 304 e o *kit Taq DNA polymerase recombinant* (Invitrogen™). Tanto a extração de RNA como a RT-PCR foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Para cada amostra amplificada foi realizado o sequenciamento genético com cada *primer* descrito anteriormente senso e antisenso separadamente, utilizando-se 4 µl de BigDye 3.1 (Applied Biosystems®), 3,2 pmol de cada primer, 30 a 50 ng do DNA alvo e água DNase/RNase free q.s.p. para uma reação final de 10 µl. O produto desta reação foi novamente purificado com o Sephadex (GE Healthcare™) em placa de 96 poços seguindo as instruções do fabricante posteriormente esta placa foi levada ao analisador genético automático ABI-3130 (Applied Biosystems™), para a obtenção dos eletroferogramas das sequências de DNA. Os nucleotídeos dos eletroferogramas foram conferidos manualmente com o programa Chromas v. 2.23 (© 1998-2002 Technelysium Pty LTD) e a sequência final obtida com o aplicativo Cap-Contig do programa BIOEDIT v. 5.0.9 (HALL, 1999) que foi comparada com outras recuperadas pelo BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para obter as identidades das linhagens genéticas das amostras. As sequências foram alinhadas pelo método CLUSTAL/W, para tanto foi utilizado o programa BIOEDIT, v. 5.0.9. As árvores filogenéticas foram obtidas utilizando o algoritmo Neighbor-Joining e modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros, com 1000 repetições de bootstrap com o programa MEGA (KUMAR, et al., 2001). A qPCR foi realizada utilizando o sistema SyBR Green I e os primers antisenso 304 e senso 504 (5'-TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACT-3') (MACEDO et al., 2006; BRITO et al., 2011). Para a realização da RT-PCR em tempo real foram utilizados 2µL por amostra, acrescidos de 9µL de água livre de nucleases, 12,5µL de 2X Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 0,75µL de cada *primer* senso e antissenso (504 e 304) a 10µM. Cada amostra foi analisada em duplicata, utilizando placa de 96 orifícios *MicroAmp® Optical 96 well Reaction Plate*, no aparelho de PCR em tempo real *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*.

Os resultados foram analisados no *7500 Software v.2.0.5*. A comprovação da especificidade da reação foi realizada pela análise da curva de dissociação ou de *melting*. Foram consideradas positivas pela RT-qPCR as amostras que apresentarem ciclo de quantificação (Cq) <35. Quando as amostras apresentaram o Cq>35 ou Cq<40, foram consideradas de resultado inconclusivo, sendo necessária a eletroforese em gel de agarose 1% das reações. Já quando as amostras apresentarem Cq>40, foram consideradas negativas.

5.4.3 Análise estatística

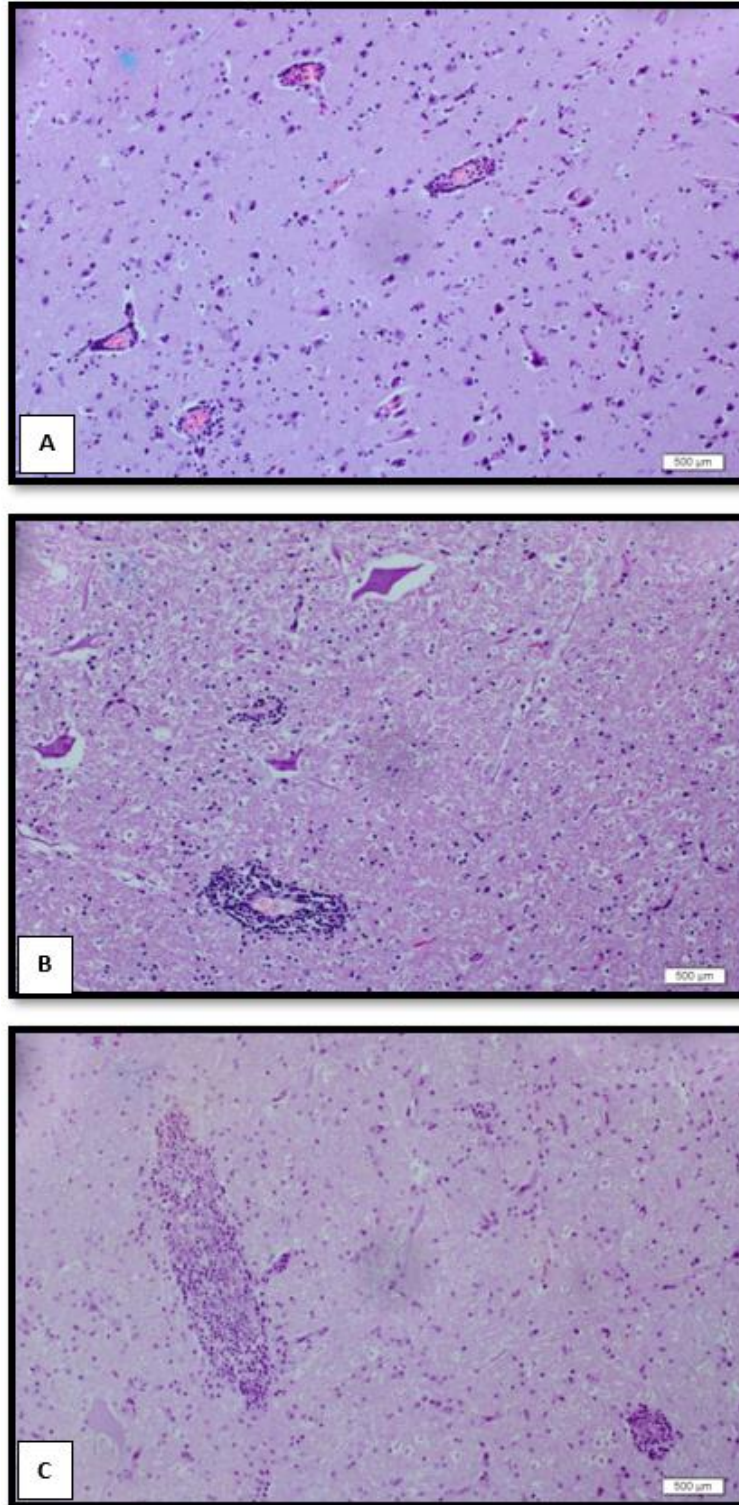
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados das variáveis quantitativas (intensidade da lesão inflamatória e presença de inclusões de Negri) foram submetidos à análise de variância utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS®. Os dados da variável intensidade foram analisados como medidas repetidas no espaço para cada animal (variável aleatória). O modelo estatístico inclui os efeitos do grupo e da região do sistema nervoso e da interação entre estas variáveis. A normalidade dos resíduos foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Os dados das variáveis binárias, como a inclusão, positividade dos testes e da PCR, foram avaliadas através de um modelo linear generalizado, com distribuição binomial (regressão logística), utilizando-se o procedimento GENMOD do pacote estatístico SAS, sendo as prevalências médias comparadas pela opção LSMEANS ao nível de 5% de significância.

5.5 RESULTADOS

Todas as amostras foram confirmadas como positivas para raiva através da IHQ e IFD. As lesões histológicas foram caracterizadas por meningoencefalite linfocítica e macrofágica associadas a Corpúsculo de inclusões de Negri em 28 casos. Os bovinos que não apresentaram inclusões de Negri pertencem aos grupos estação e decúbito esternal (39960, 43299, 41900). Um animal (39961) apresentou inclusões apenas no gânglio trigeminal. Em todos os grupos analisados observaram-se intensidades de lesões histológicas que variaram de 0 a 3 (Figura 1).

Figura 1 - Histologia do SNC de bovino positivo para raiva. A) Infiltrado mononuclear leve com até duas camadas de células inflamatórias perivascular e gliose leve. B) Infiltrado mononuclear moderado com 3-4 camadas de células inflamatórias perivascular. C) Infiltrado mononuclear moderado com mais de 4 camadas de células inflamatórias perivascular. HE, Obj 40x.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

As regiões encefálicas com maior intensidade de lesão inflamatória foram o óbex seguido pelo colículo e tálamo sem diferença estatística entre si ($p>0,005$). O trigêmeo foi a quarta região mais afetada tendo intensidade de lesão inflamatória semelhante as área mais e menos acometidas pela lesão inflamatória (Tabela 1). A intensidade das lesões histológicas, nas diferentes áreas do encéfalo, de cada amostra analisada pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2 - Estimativa da intensidade de lesão em cada região encefálica.

REGIÃO ENCEFÁLICA	ESTIMATIVA
Óbex	2.3083 ^a
Colículo	2.1458 ^a
Tálamo	2.0125 ^a
Trigêmeo	1.9089 ^{ab}
Complexo estriado	1.5502 ^{bc}
Medula	1.4569 ^{bc}
Cerebelo	1.3333 ^{cd}
Córtex frontal	1.0787 ^{de}
Telencéfalo parietal	0.9917 ^e
Hipocampo	0.9750 ^e
Telencéfalo occipital	0,6421 ^f

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($P > 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Dos 31 bovinos analisados 28 apresentaram inclusões de Negri. Os três animais que não apresentaram corpúsculo pertencem aos grupos estação (bovinos 39960, 43299) e decúbito esternal (bovino 41900). Três bovinos 39964, 39961 e 40964, apresentaram inclusões apenas em uma área encefálica e pertenceram respectivamente aos grupos decúbito esternal, decúbito lateral e morte espontânea. Os corpúsculos de Negri foram observados em maior porcentagem no cerebelo (74%), seguido pelo óbex (61,29%), complexo estriado e córtex frontal (60%). A porcentagem de corpúsculo de Negri por área e a presença de corpúsculo por área em cada animal analisado pode ser observados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Intensidade das lesões histológicas, por área encefálica, nos diferentes grupos de evolução clínica.

BOV	GRUPO	DIA DA MORTE	HISTOPATOLOGIA - INTENSIDADE DE INFLAMAÇÃO										
			ME	TR	OB	C R	C O	CF	CE	TP	TA	TO	H I
39958	G1	4	2	3	3	1	3	0	3	1	3	1	1
39960	G1	3	3	1	3	1	3	1	0	0	2	0	0
39963	G1	3	NA	3	2	1	3	1	2	1	2	0	1
41901	G1	4	1	NA	2	1	2	1	2	2	1	1	1
43220	G1	5	2	1	3	3	2	2	3	2	2	1	2
43299	G1	2	0	0	2	1	2	1	1	1	3	1	1
37855	G2	6	0	NA	1	0	1	1	0	0	1	0	0
39947	G2	5	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
39964	G2	6	NA	NA	1	1	2	1	1	1	2	0	0
41900	G2	2	2	2	2	2	1	0	1	1	1	1	0
43297	G2	4	1	NA	2	1	2	NA	NA	1	1	0	1
43298	G2	5	1	1	2	1	2	0	1	0	2	1	1
37637	G3	8	1	1	2	2	2	1	1	1	2	NA	1
37813	G3	8	1	NA	3	2	2	2	2	1	2	2	2
39941	G3	8	NA	NA	1	1	1	0	0	0	1	0	0
39942	G3	3	NA	NA	2	1	2	NA	1	1	1	0	1
39943	G3	5	1	NA	2	1	2	1	2	1	2	1	1
39948	G3	7	NA	2	2	1	2	NA	1	0	1	0	0
39959	G3	7	NA	2	3	1	1	0	1	0	1	0	1
39961	G3	74	NA	1	2	1	1	0	1	0	1	0	0
40973	G3	5	0	NA	2	1	3	2	2	1	2	1	1
41173	G3	2	3	2	3	3	2	1	1	1	3	0	0
41840	G3	5	2	NA	3	2	2	2	2	2	2	2	2
41841	G3	3	2	NA	3	3	3	2	2	1	2	1	2
41854	G3	7	3	1	3	2	3	2	2	1	3	1	2
41968	G3	4	1	1	3	3	2	2	2	1	3	0	2
41969	G3	4	2	1	2	1	2	0	2	1	1	0	1
39337	G4	5	1	3	3	1	3	1	1	1	2	0	1
40964	G4	6	2	NA	3	1	2	1	2	1	3	1	0
41777	G4	3	NA	NA	3	2	3	2	3	2	3	1	2
41778	G4	3	2	NA	3	2	3	3	3	2	3	2	3

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

G1: Bovino em estação; G2: Decúbito esternal; G3: Decúbito lateral; G4: Morte espontânea. NA: região não avaliada; (0): Ausência de lesões; (1) inflamação leve; (2) inflamação moderada; (3) inflamação acentuada; ME: medula espinhal; TR: gânglio trigeminal; OB: óbex; CR: cerebelo; CO: colículos; CF: córtex frontal; CE: complexo estriado; TP: telencéfalo parietal; TA: tálamo; TO: telencéfalo occipital; HI: hipocampo.

Tabela 4 - Porcentagem de corpúsculos de inclusão de Negri nas diferentes regiões encefálicas.

REGIÃO ENCEFÁLICA	PERCENTAGEM DE C. NEGRI
Cerebelo	74.19 ^a
Óbex	61.29 ^{ab}
Complexo estriado	60.00 ^{ab}
Cortex frontal	60.00 ^{ab}
Hipocampo	48.39 ^b
Telen. Parietal	48.39 ^b
Colículo	43.33 ^b
Medula	40.74 ^b
Telencéfalo occipital	38.71 ^b
Trigêmio	36.84 ^b
Tálamo	35.48 ^b

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($P > 0,05$) pelo Teste de Tukey.

A evolução clínica da doença não influenciou na intensidade de lesão inflamatória, mas influenciou na presença dos corpúsculos de Negri. Os animais mortos naturalmente e eutanasiados em estação tiveram intensidade de inflamação semelhantes entre si e maior que naqueles animais eutanasiados em estágios intermediários de evolução (decúbito esternal e lateral) porém os animais com morte natural tiveram maior probabilidade de apresentar inclusões do que animais eutanasiados para exame. A relação da evolução clínica com a intensidade de lesão inflamatória e presença do corpúsculo pode ser vista nas tabelas 5.

Tabela 5 - Presença de corpúsculo de Negri, por área encefálica, nos diferentes grupos de evolução clínica, nos diferentes animais.

BOV	GRUPO	DIA DA MORTE	HISTOPATOLÓGICO – INCLUSÃO										
			ME	TR	OB	CR	CO	CF	CE	TP	TA	TO	HI
39958	G1	4	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
39960	G1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39963	G1	3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
41901	G1	4	-	NA	+	+	-	-	-	-	-	-	-
43220	G1	5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43299	G1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37855	G2	6	+	NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
39947	G2	5	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
39964	G2	6	NA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
41900	G2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43297	G2	4	-	NA	+	+	+	NA	NA	-	+	-	-
43298	G2	5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
37637	G3	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
37813	G3	8	+	NA	+	+	+	+	-	+	-	+	+
39941	G3	8	+	NA	+	+	-	+	+	+	-	+	+
39942	G3	3	-	NA	-	+	-	-	-	-	-	-	-
39943	G3	5	+	NA	+	-	-	+	+	-	+	+	+
39948	G3	7	NA	-	+	+	NA	+	+	-	-	-	+
39959	G3	7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
39961	G3	74	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40973	G3	5	-	NA	+	-	+	+	+	+	-	+	+
41173	G3	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
41840	G3	5	-	NA	-	+	-	+	+	-	-	-	-
41841	G3	3	-	NA	-	+	-	+	+	+	-	-	+
41854	G3	7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41968	G3	4	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
41969	G3	4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
39337	G4	5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
40964	G4	6	NA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
41777	G4	3	NA	NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41778	G4	3	+	NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

G1: Bovino em estação; G2: Decúbito esternal; G3: Decúbito lateral; G4: Morte espontânea. NA: região não avaliada; (+): Presença de inclusões de Negri. (-): Ausência de inclusões de Negri. ME: medula espinhal; TR: gânglio trigeminal; OB: óbex; CR: cerebelo; CO: colículos; CF: córtex frontal; CE: complexo estriado; TP: telencéfalo parietal; TA: tálamo; TO: telencéfalo occipital; HI: hipocampo.

Tabela 6 - Efeito da evolução clínica da raiva na presença do corpúsculo de Negri e na intensidade de lesão inflamatória.

EVOLUÇÃO CLÍNICA	% DE C. NEGRI	INT. DE LESÃO MÉDIA
Estação	36.92c	1.81 ab
Decúbito esternal	36.07 c	1.06 c
Decúbito lateral	55.13b	1.66 b
Morte espontânea	75a	2.3 a

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($P > 0,05$) pelo Teste de Tukey.

A análise comparativa entre as sequencias geradas e as sequencias recuperadas do *GenBank* evidenciou que todas as amostras de RABV isoladas incluídas no presente estudo apresentam linhagem genética característica de morcegos hematófagos *D. rotundus*. A árvore filogenética pode ser observada na figura 2.

Das 31 amostras coletadas 9 amplificaram, sendo que a quantidade de vírus não teve relação com a média da intensidade de lesão e a evolução clínica. A relação dos ciclos do PCR com a evolução clínica e intensidade de lesão pode ser vista na tabela 6. Os Bovinos 2 e 4, com maior carga viral, tiveram intensidade de lesões semelhantes aqueles menos taxa de replicação viral (bovinos 1 e 7).

Tabela 7 - Relação entre as variáveis evolução clínica, média de lesão, quantidade e tipo de vírus.

ID	GRUPOS	DIA DA EUTANÁSIA	LESÃO MÉDIA	CT PCR	TIPO VIRAL
39960	Estação	3	1,27	28,05	<i>D. rotundus</i>
39963	Estação	3	1,6	13,074	<i>D. rotundus</i>
39964	Dec. esternal	6	1	19,431	<i>D. rotundus</i>
37637	Dec. lateral	8	1,4	18,29	<i>D. rotundus</i>
37813	Dec. lateral	8	1,9	19,092	<i>D. rotundus</i>
41840	Dec. lateral	5	2.1	22,7	<i>D. rotundus</i>
41968	Dec. lateral	4	1,8	32, 396	<i>D. rotundus</i>
40964	Morte esp.	6	1,6	22,41	<i>D. rotundus</i>
41778	Morte esp.	3	2,6	21,348	<i>D. rotundus</i>

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Figura 2 - Árvore filogenética de distância com algoritmo Neighbor-joining e modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros (K2p) construída a partir de 1.314 nucleotídeos do gene N que codifica a nucleoproteína do vírus da raiva (RABV), evidenciando os clados 1 no qual estão todas as amostras desse estudo indentificados como linhagem genética característica de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Cluster 1: amostras com linhagem genética característica de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*; Cluster 2: amostras com linhagem genética característica de morcegos não hematófagos; Cluster 3: amostras com linhagem genética característica de caninos domésticos.

5.6 DISCUSSÃO

Sabe-se que a intensidade das lesões histológicas da raiva é bastante variável (SUMMERS; CUMMINGS; DELAHUNTA, 1995). Acredita-se que vários fatores podem influenciar nas lesões histológicas de raiva e no aparecimento das inclusões de Negri como: o estágio e curso da doença, além da cepa e concentração do vírus (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

Nesse estudo constou-se que a presença do Corpúsculo de Negri é influenciado pela evolução clínica da doença, pois dos 31 casos analisados as 3 amostras que não apresentaram Corpúsculo Negri foram animais eutanasiados em estágios precoces da doenças. Segundo Summers, Cummings, Delahunta (1995), o sacrifício de animais infectados pode resultar em casos com ausência de corpúsculos de Negri. Segundo Langohr e seus colaboradores (2003) as inclusões são mais frequentemente detectadas em animais que sobreviveram por mais de 4 dias após o início dos sinais clínicos. Isso também foi observado analisando individualmente cada amostra, pois novamente os animais sem corpúsculo foram eutanasiados até 3 dias após o início dos sinais clínicos.

Em contrapartida a velocidade da evolução clínica da doença para a morte parece não interferir nos corpúsculos. A análise dos animais com morte espontânea, indica que muito ainda temos que descobrir sobre a formação do corpúsculo, pois os bovinos 41777 e 41778, que morreram de forma espontânea em até 3 dias após o início dos sinais clínicos apresentaram corpúsculo de inclusão em todas as áreas analisadas e o bovino 40964, que morreu em 6 dias de evolução clínica, apresentou corpúsculo apenas no cerebelo.

O cerebelo foi a região com a maior probabilidade de serem observadas as inclusões. Fato semelhante já havia sido observado por outros autores, que sugerem que esse seria o local mais indicado para visualização das inclusões em bovinos (LANGOHR et al., 2003; LIMA et al., 2005; SILVA et al., 2010). Neste estudo observou-se que todos os bovinos eutanasiados após apresentarem decúbito permanente, tinham inclusões de Negri em pelo menos uma das regiões encefálicas analisadas. Contudo o bovino 39961 apresentou inclusões apenas no gânglio trigêmeo, isso alerta para que embora o cerebelo seja uma das regiões recomendadas para análise em bovinos a avaliação mais criteriosa de outras áreas do sistema nervoso como a medula, região do tronco e gânglio trigêmeo podem ser importantes para conclusão do diagnostico através do corpúsculo de Negri.

Quanto as alterações inflamatórias, estas geralmente estão presentes, entretanto há casos em que elas são leves ou estão até mesmo ausentes (MAXIE; YOSSELF, 2006). Em nosso estudo observamos que a intensidade da inflamação foi maior nos grupos dos animais

eutanasiados em pé e com morte espontânea. Diferindo do descrito por Marcolongo-Pereira et al. (2011), onde bovinos com evolução de 3 a 4 dias, não apresentaram lesões histológicas no SNC e de Lima et al. (2005), que observaram lesões mais acentuadas em animais com curso clínico mais longo.

Segundo Maxie, Yossell (2006), os corpúsculos de inclusão de Negri tendem a ser mais escassos onde a inflamação é mais grave. Neste estudo não foi estabelecida relação entre a presença de inclusões e a intensidade do infiltrado inflamatório como outrora também constatado por Langohr et al. (2003) e Beck et al. (2017), pois a região com maior intensidade de lesão inflamatória, o óbex, também foi a segunda região com maior probabilidade em se detectar inclusões de Negri.

Óbex, colículo e tálamo foram as regiões encefálicas com maior intensidade de lesão, seguidos de gânglio trigeminal, medula espinhal, cerebelo e hipocampo. Esses dados corroboram com descrito por Langohr et al. (2003) que observaram alterações histopatológicas principalmente no tronco encefálico, cerebelo e medula espinhal. O aumento das lesões inflamatórias no tronco em relação as demais áreas podem estar relacionado pela característica da infecção viral, pois o vírus chega ao sistema nervoso central através de transporte axonal retrógrado (BECK et al., 2017; SWANEPOEL, 2004). A inflamação no tronco cerebral mais pronunciada poderia impedir a propagação viral para os hemisférios cerebrais (SHUANGSHOTI et al., 2013).

Os dados de filogenia constatarem a linhagem genética de RABV característica de morcegos hematófagos *D. rotundus* das sublinhagens (1B) em 9 amostras e todas elas apresentaram intensidades de lesões inflamatórias semelhantes. Esses dados sugerem que a variação detectada na intensidade de lesões inflamatórias não está relacionada ao tipo de vírus. A avaliação de qRT-PCR não demonstrou relação da intensidade de lesão com maior quantidade de vírus. Zhao et al. (2009) já haviam mencionado anteriormente que a diferença na patogenicidade estaria relacionada a maior duração de expressão de citocinas e quimiocinas do que a efeitos da replicação viral. Apolinário et al. (2015) em seus estudos constatarem que animais que apresentaram maiores níveis de replicação apresentaram maior fluorescência na IFD, entretanto não observaram relação da replicação com diferentes apresentações clínicas, sugerindo que a replicação viral não desempenha papel importante no resultado da infecção e não seria o único fator relacionado a letalidade.

5.7 CONCLUSÕES

Este trabalho indica que a evolução clínica da doença da raiva em bovinos não interfere na intensidade da lesão inflamatória nas diferentes áreas do encéfalo de bovinos, mas influencia na presença dos corpúsculos de Negri, havendo uma tendência maior de se encontrar inclusões de Negri em bovinos mortos naturalmente em relação aos eutanasiados para exame. O tipo do vírus envolvido e a quantidade de replicação não demonstraram interferência na intensidade das lesões histológicas, na evolução clínica da doença e na presença do corpúsculo.

5.8 REFERÊNCIAS

- APPOLINÁRIO, C. et al. Fluorescent antibody test, quantitative polymerase chain reaction pattern and clinical aspects of rabies virus strains isolated from main reservoirs in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [Amsterdã], v. 19, n. 5, p. 479-485, set./out. 2015.
- BECK, S. et al. Pathobiological investigation of naturally infected canine rabies cases from Sri Lanka. **BMC Veterinary Research**, [Londres], v. 13, n. 99, p. 1-9, abr. 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Controle de Raiva em Herbívoros: manual técnico 2009**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 124p.
- DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: Meslin, F. X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, H. (Eds), **Laboratory Techniques in Rabies**. v. 1. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 88-93.
- FERNANDES, C.G.; RIET-CORREA, F. Raiva. In: RIET-CORREA, F. et al. (Eds), **Doenças dos Ruminantes e Equídeos**. v. 1. 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. p. 184-198.
- GERMANO, P. M. L. et al. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos, aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária**, [São Paulo] v. 14, n.1, p. 133-141, 1977.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, [Oxford], v. 41, p. 95-98, 1999.

KUMAR, A. et al. An Unexpected Extended Conformation for the Third TPR Motif of the Peroxin PEX5 from Trypanosoma brucei. **Journal of Molecular Biology**, [Amsterdã], v. 307, n. 1, p. 271-282, mar. 2001.

LIMA, E. F. et al. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [Seropédica], v. 25, n. 4, p. 250-264, oct./dec. 2005.

LANGOHR, I. M. et al. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. **Ciência Rural**, [Santa Maria], v. 33, n. 1, p. 125-131, jan./fev. 2003.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Raiva em bovinos na Região Sul do Rio Grande do Sul: epidemiologia e diagnóstico imuno-histoquímico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [Seropédica], v. 31, n. 4, p. 331-335, abr. 2011.

MAXIE, M. G.; YOUSSEF, S. The nervous system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**, 4. ed, v. 1, San Diego: Academic Press, 2006. p. 267-439.

PEDROSO, P. M. O. et al. Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [Seropédica], v. 28, n. 12, p. 627-632, dez. 2008.

SANCHES, A. W. D. et al. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [Seropédica], v. 20, n. 3, p. 113-118, jul./set. 2000.

SHARMA, P. et al. Diagnosis of rabies from brain: Comparison of histochemical and histopathological approaches. **Indian Journal of Veterinary Pathology**. [Mathura], v. 38, n. 4, p. 269-272, jan. 2014.

SILVA, M. L. C. R. et al. Distribuição do vírus rábico no sistema nervoso central em ruminantes naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [Seropédica], v. 30, n. 11, p. 940-944, nov. 2010.

SHUANGSHOTI, S. et al. Reduced viral burden in paralytic compared to furious canine rabies is associated with prominent inflammation at the brainstem level. **BMC Veterinary Research**, [Londres], v. 9, n. 31, p. 1-11, fev. 2013.

SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J.; DELAHUNTA, A. **Veterinary neuropathology**. 1. ed. Saint Louis: Mosby, 1995. 527 p.

SWANEPOEL, R. Rabies. In: COETZAR, J. A. W.; TUSTIN, R. C. (Eds), **Infectious Disease of Livestock**. v. 2, 2.ed. Reino Unido: Oxford University Press, 2004.

TEKKI, I. S. et al. Comparative assessment of seller's staining test (SST) and direct fluorescent antibody test for rapid and accurate laboratory diagnosis of rabies. **African Health Sciences**, [Uganda], v. 16, n. 1, p. 123-127, mar. 2016.

ZHAO, L. et al. The Roles of Chemokines in Rabies Virus Infection: Overexpression May Not Always Be Beneficial. **Journal of Virology**, [Washington], v. 83, n. 22, p. 11808-11818, nov. 2009.

WORLD Health Organization. Who Expert Consultation on Rabies. Genebra: World Health Organization. 2013. Disponível em:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85346/1/9789241209823_eng.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2014.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A eutanásia em diferentes estágios evolutivos não prejudicou o diagnóstico laboratorial de raiva bovina. O diagnóstico rápido e seguro necessário para que medidas de controle efetivas sejam tomadas rapidamente, evitando prejuízo econômicos e a ocorrência de epizootias, assegurando o bem-estar animal e principalmente garantindo que os humanos fiquem o menor tempo em contato com os animais doentes, minimizando o risco de contágio.

A evolução clínica da raiva em bovinos não interferiu na intensidade da lesão inflamatória nas diferentes áreas do encéfalo de bovinos, mas influenciou na presença dos corpúsculos de Negri, havendo uma tendência maior de se encontrar inclusões de Negri em bovinos mortos naturalmente em relação aos eutanasiados para exame. O tipo do vírus envolvido e a quantidade de replicação não demonstraram interferência na intensidade das lesões histológicas, na evolução clínica da doença e na presença do corpúsculo de Negri.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. C. et al. Domestic microwave processing for rapid immunohistochemical diagnosis of bovine rabies. **Histology and Histopathology**, [Espanha], v. 27, n. 9, p. 1227-1230, set. 2012.
- ACHKAR, S. M. et al. Sensibilidade da técnica de Imunohistoquímica em fragmentos de sistema nervoso central de bovinos e equinos naturalmente infectados pelo vírus da raiva. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [Seropédica], v. 30, n. 3, p. 211-218, mar. 2010.
- ALBERTINI, A. A.; RUIGROK, R. W.; BLONDEL, D. Rabies virus transcription and replication. **Advances in Virus Research**, [Amsterdã], v. 79, p. 1–22, dez. 2011.
- APPOLINÁRIO, C. et al. Fluorescent antibody test, quantitative polymerase chain reaction pattern and clinical aspects of rabies virus strains isolated from main reservoirs in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [Amsterdã], v. 19, n. 5, p. 479-485, set./out. 2015.
- BAGÓ, Z.; REVILLA-FERNANDEZ, S.; ALLERBERGER, F. Value of Immunohistochemistry for rapid ante mortem rabies diagnosis. **Intenacional Journal of Infectious Diseases**, [Oxford], v. 9, p. 351-352, 2005.
- BARROS, C. S. L. et al. **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. São Paulo: Vallée. 2006. p. 21-28.
- BASSUINO, D.M. et al. Characterization of spinal cord lesions in cattle and horses with rabies: the importance of correct sampling. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. [California], v. 28. 4. ed. p.455-460, jul. 2016
- BECK, S. et al. Pathobiological investigation of naturally infected canine rabies cases from Sri Lanka. **BMC Veterinary Research**, [Londres], v. 13, n. 99, p. 1-9, abr. 2017.
- BEIGH, A. B. et al. Comparative evaluation of clinicopathological, immunohistochemical, and immunofluorescent techniques for diagnosis of rabies in animals. **Comparative Clinical Pathology**, [Nova Iorque], v. 24, n. 5, p. 1177–1184, jan. 2015.
- BLANTON, J. D. et al. Rabies surveillance in the United States during 2008. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [Schaumburg], v. 235, n. 6, p. 676–689, set. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Controle de Raiva em Herbívoros: manual técnico 2009**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 124p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Departamento de Saúde Animal**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Ministério da Saúde, Raiva: situação epidemiológica, 2018**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2018.

BURTON, E. C. et al. Rabies encephalomyelitis: clinical, neuroradiological and pathological findings in 4 transplant recipients. **Archives of Neurology**, [Chicago], v. 62, n. 6, p. 873-882, jun. 2005.

CARNIELI, P. et al. Molecular epidemiology of *rabies virus* strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. **Virus Research**, [Amsterdã], v. 120, n. 1/2, p. 113-120, set. 2006.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002**. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. Brasília, DF, 2002.

DIRETORIA de Vigilância Epidemiológica. Situação epidemiológica da raiva no estado de Santa Catarina. Florianópolis: Secretaria de Estado da Saúde Sistema Único de Saúde Superintendência de Vigilância em Saúde Diretoria de Vigilância Epidemiológica. 2012. Disponível em:
<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/canideos_felinos/Situacao_Raiva_SC.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2012.

DIRETORIA de Vigilância Epidemiológica. Alerta Epidemiológico. Florianópolis: Secretaria de Estado da Saúde Sistema Único de Saúde Superintendência de Vigilância em Saúde Diretoria de Vigilância Epidemiológica. 2016. Disponível em:
<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/AlertaEpidemiologico%20_RaivaCanina_%2023_09.pdf>. Acesso em: 09 ago. 2018.

ESCOBAR, L. E. et al. Ecology and geography of transmission of two bat-borne rabies lineages in Chile. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [California], v. 7, n. 12, p. 1-10, dez. 2013.

FAIZEE, N. et al. Pathological, Immunological and Molecular Diagnosis of Rabies in Clinically Suspected Animals of Different Species Using Four Detection Techniques in

Jordan. **Transboundary and Emerging Diseases**, [Hoboken], v. 59, n. 2, p. 154-164, abr. 2012.

FERNANDES, C.G.; RIET-CORREA, F. Raiva. In: RIET-CORREA, F. et al. (Eds), **Doenças dos Ruminantes e Equídeos**. v. 1. 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. p. 184-198.

FERREIRA, R. S. et al. Bovine rabies incidence in the state of Minas Gerais/Brazil, between 2002 and 2006. **Arquivos do Instituto Biológico**, [São Paulo], v. 79, n. 2, p. 287-291, abr./jun. 2012.

FITZPATRICK, M. C. et al. Potential for rabies control through dog vaccination in wildlife-abundant communities of Tanzania. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [California], v. 6, n. 8, p. 1-6, ago. 2012.

GERMANO, P. M. L. et al. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos, aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária**, [São Paulo] v. 14, n.1, p. 133-141, 1977.

GREENE, C. E.; RUPPRECHT, C. E. Rabies and other lyssavirus infections. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. v. 1, 4.ed. Saint Louis: Elsevier Saunders, 2006. p. 167–183.

HEALY, D. M. et al. Pathobiology of rabies virus and the European bat lyssaviruses in experimentally infected mice. **Virus Research**, [Amsterdã], v. 172, n. 1/2, p. 46-53, mar. 2013.

HEATON, P. R.; MCELHINNEY, L. M.; LOWINGS, J. P. Detection and identification of rabies and rabies related viruses using rapid - cycle PCR. **Journal of Virological Methods**, [Amsterdã], v. 81, n. 1/2, p. 63-69, ago. 1999.

HEMACHUDHA, T. et al. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management. **Lancet Neurology**, [Reino Unido], v. 12, n. 5, p. 498-513, maio 2013.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.

KANITZ, F. A. et al. Virus isolation in cell culture for confirmatory diagnostic of rabies in bovine specimens. **Ciência Rural**, [Santa Maria], v. 45, n. 12, p. 2193-2196, dez, 2015.

LAHAYE, X. et al. Hsp70 protein positively regulates rabies virus infection. **Journal of Virology**, [Washington], v. 86, n. 9, p. 4743– 4751, maio 2012.

LANGOHR, I. M. et al. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. **Ciência Rural**, [Santa Maria], v. 33, n. 1, p. 125-131, jan./fev. 2003.

LEMBO, T. et al. Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. **Emerging Infectious Disease**, [Atlanta], v. 12, n. 2, p. 310-313, fev. 2006.

LIMA, E. F. et al. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [Seropédica], v. 25, n. 4, p. 250-264, oct./dez. 2005.

MADHUSUDANA, S. N. et al. Evaluation of a Direct Rapid Immunohistochemical Test (dRIT) for rapid diagnosis of Rabies in Animals and Humans. **Virologica Sinica**, [Wuhan], v. 27 n. 5, p. 299-302, out. 2012.

MAXIE, M. G.; YOUSSEF, S. The nervous system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**, 4. ed, v. 1, San Diego: Academic Press, 2006. p. 267-439.

NAGARAJ, T. et al. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: Comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. **Journal of Clinical Virology**, [Londres], v. 36, n.1, p.17-23, maio 2006.

PAWESKA, J. T. et al. Fatal human infection with rabies-related Duvenhage virus, South Africa. **Emerging Infectious Disease**, [Atlanta], v. 12, n. 12, p. 1965-1967, dez. 2006.

PEDROSO, P. M. O. et al. Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [Seropédica], v. 28, n. 12, p. 627-632, dez. 2008.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, Caprinos e eqüinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

RODRIGUEZ, L. L. et al. **Virologia Veterinaria**, 1. ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. 888 p.

RUPPRECHT, C. E.; GIBBONS, R. V. Clinical practice. Prophylaxis against rabies. **New England Journal of Medicine**, [Waltham], v. 351, n. 25, p. 2626-2635, dez. 2004.

SANCHES, A. W. D. et al. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [Seropédica], v. 20, n. 3, p. 113-118, jul./set. 2000.

SCHAEFER, R. et al. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. **Veterinary Microbiology**, [Amsterdã], v. 107, n. 3/4, p. 161-170, maio 2005.

SHARMA, P. et al. Diagnosis of rabies from brain: Comparison of histochemical and histopathological approaches. **Indian Journal of Veterinary Pathology**. [Mathura], v. 38, n. 4, p. 269-272, jan. 2014.

SHUANGSHOTI, S. et al. Reduced viral burden in paralytic compared to furious canine rabies is associated with prominent inflammation at the brainstem level. **BMC Veterinary Research**, [Londres], v. 9, n. 31, p. 1-11, fev. 2013.

SILVA, M. L. C. R. et al. Distribuição do vírus rábico no sistema nervoso central em ruminantes naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [Seropédica], v. 30, n. 11, p. 940-944, nov. 2010.

SILVA, S. R. et al. Biotechnology advances: A perspective on the diagnosis and research of *Rabies Virus*. **Biologicals**, [Amsterdã], v. 41, n. 4, p. 217-223, jul. 2013.

SINGH, R. et al. Rabies – epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, [Londres], v. 37, n. 1, p. 212-251, dez. 2017.

SRINIVASAN, A. et al. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. **New England Journal of Medicine**, [Waltham], v. 352, n. 11, p. 1103-1111, mar. 2005.

SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J.; DELAHUNTA, A. **Veterinary neuropathology**. 1. ed. Saint Louis: Mosby, 1995. 527 p.

SWANEPOEL, R. Rabies. In: COETZAR, J. A. W.; TUSTIN, R. C. (Eds), **Infectious Disease of Livestock**. v. 2, 2.ed. Reino Unido: Oxford University Press, 2004.

TEKKI, I. S. et al. Comparative assessment of seller's staining test (SST) and direct fluorescent antibody test for rapid and accurate laboratory diagnosis of rabies. **African Health Sciences**, [Uganda], v. 16, n. 1, p. 123-127, mar. 2016.

TIRAWATNPONG, S. et al. Regional distribution of rabies viral antigen in central nervous system of human encephalitic and paralytic rabies. **Journal of the Neurological Sciences**, [Amsterdã], v. 92, n. 1, p. 91-99, ago. 1989.

TSIANG, H. et al. Infection of cultured rat myotubes and neurons from the spinal cord by rabies virus. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, [Oxford], v. 45, n. 1, p. 28-42, jan. 1986.

WADA, M. Y.; ROCHA, S. M.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S. Situação da raiva no Brasil, 2000 a 2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [Brasília], v. 20, n. 4, p. 509-518, out./dez. 2011.

WANG, L. et al. Role of the blood-brain barrier in rabies virus infection and protection. **Protein & Cells**, [Heidelberg], v. 4, n. 12, p. 901-903, dez. 2013.

WISSER, C. S. **Imunocitoquímica no diagnóstico de raiva em bovinos e estudo retrospectivo**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014.

WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. **Clinica Chimica Acta**. [Nova Iorque], v. 351, n. 1-2, p. 49-63, jan. 2005.

WORLD Health Organization. Who Expert Consultation on Rabies. Genebra: World Health Organization. 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85346/1/9789241209823_eng.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2014.

YANG, D. K. et al. The present and future of rabies vaccine in animals. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, [Coreia], v. 2, n. 1, p. 19-25, jan. 2013.

ZACHARY, J. F. Sistema Nervoso. In: McGAVIN, M. D; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 1476 p.

ZHOU, H. et al. Probable Rabies Virus Transmission through Organ Transplantation, China, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, [Atlanta], v. 22, n. 8, ago. 2016.

ZHU, S.; GUO, C. Rabies control and treatment: From prophylaxis to strategies with curative potential. **Viruses**, [Basileia], v. 8, n. 11, p. 1-23, nov. 2016.