



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ - UECE

BENEDITO NEILSON ROLIM

**MEDULA CERVICAL COMO MATERIAL
PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA RAIVA**

Fortaleza – Ceará
Julho 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ - UECE

BENEDITO NEILSON ROLIM

**MEDULA CERVICAL COMO MATERIAL
PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA RAIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará - UECE, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área concentração: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros e aves.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira

Fortaleza – Ceará
Julho 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ - UECE

CURSO DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**MEDULA CERVICAL COMO MATERIAL
PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA RAIVA**

Autor: BENEDITO NEILSON ROLIM

Defesa: 31/07/2007

Conceito obtido: Satisfatório

Banca Examinadora

Maria Fátima da Silva Teixeira Profa. D. Sc.
Orientadora

Marcos Fábio Gadelha Rocha. Prof. D Sc.
Examinador

Valeska Shelda Pessoa de Melo. D Sc.
Examinadora

IN MEMORIA

Ao grande arquiteto do universo. Ao meu cunhado, Heider Guedes Barros Lima, como médico veterinário me incentivou a ingressar nessa belíssima e gratificante profissão, que com muito orgulho exerço. Ao meu pai, Manoel de Moura Rolim, pela criação e ensinamentos formadores do meu caráter e da minha personalidade; estes valores deixaram um marco profundo em nosso convívio.

Com carinho

Benedito Neilson

Rolim

Com muito carinho a minha mãe,
Francisca Tabosa de Moura Rolim,
minha esposa Josimeire Barreto de
Sousa Rolim, meus filhos: Pedro Tabosa
Moura Neto, Benedito Neilson Rolim
Filho, Brenno Barreto de Sousa Rolim,
Luísa Barreto Rolim e toda minha família.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por ter me dado a vida, a profissão de médico veterinário, meu destino, princípios de liberdade, igualdade, fraternidade, e sabedoria suficiente para superar e conduzir todas as dificuldades.

A professora Dr^a. Maria Fátima da Silva Teixeira, por ter idealizado e nos orientado nesse trabalho, possibilitando sua realização com a liberação do laboratório de virologia, pela confiança, estímulo, eficiência, dedicação e valiosas ajudas dadas no decorrer do curso, mais do que uma orientadora, uma amiga, a ela, toda minha gratidão.

A Coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, pelo apoio, competência e presença assumida na condução do Mestrado em Ciências Veterinárias, a vocês nosso total reconhecimento e gratidão.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinária pelas valiosas aulas ministradas, capacitando para o mercado de trabalho e a pesquisa. Vossas orientações, apoio e materiais, muito contribuíram para realização deste trabalho.

A banca examinadora, Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, Dra. Valeska Shelda Pessoa de Melo, Dra. Cláudia Maria Leal Beviláqua, pelas importantes correções e sugestões, as quais contribuíram de forma decisiva para a melhoria e qualidade deste trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, em especial: Adriana, Cristina, Frede, César e André Gurgel, por toda colaboração, paciência e dedicação no decorrer do curso.

Aos colegas de mestrado pela rica e agradável convivência durante o curso, e em especial, aos que fazem á família “LABOVIR – Laboratório de Virologia”: Tânia, Suzana, Aracely, Esmaille, Edmara, Valeska, Aryana, Alzira, Cínthia, Aline, Mariana, Igor, Kaline, pela amizade, companheirismo, imensas e efetivas

colaborações na dissertação do nosso trabalho e nas apresentações, além de ricas sugestões, críticas construtivas que colaboraram com a realização deste experimento.

Ao Dr. José Maria dos Santos Filho, pelos incentivo e decisivo apoio que me deu para cursa e concluir esse conceituado curso de pós-graduação.

A Dra. Phyllis Catharina Romijn, pela valiosa e indispensável colaboração no processo de aprendizado, e disposição de ajudar sempre que solicitada.

A todos os amigos de trabalho: do Núcleo de Controle de Endemias e Zoonoses; da Central de Ultra Baixo Volume; e do Laboratório de Entomologia Médica; da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Por todas as colaborações, especialmente aqueles que de forma direta e indireta contribuíram com a realização deste experimento. A vocês meus inesquecíveis agradecimentos.

Ao doutorando Cícero Temístocles Coutinho Costa, doutorando e pesquisador do Laboratório de Parasitologia do Programa de Pós Graduação de Ciências Veterinária, que gentilmente doou os primeiros *Rattus norvegicus* (wistar), nos quais produzimos os vírus utilizados no experimento.

A Universidade Federal do Ceará, em especial a bióloga, Dra. Ana de Fátima F. Urano Carvalho, diretora do Biotério Central – BIOCEN, por gentilmente ceder os *Rattus norvegicus* (wistar) destinados a este experimento.

Aos biólogos, Lindembergh Caranha e Ricristhi Gonçalves de Aguiar Gomes, por terem conseguido os supra citados animais no BIOCEN -UFC, e sua manutenção no biotério da Secretaria de Saúde - Ce, até o final do experimento.

Aos funcionários do laboratório de entomologia médica do NUEND – SESA, responsáveis pela manutenção e manejo dos animais no laboratório, incluindo feriados e finais de semana.

Ao MV. José Cleonardo da Costa Filho, que gentilmente prestou assistência médica veterinária aos animais durante todo experimento.

A MV. Katariny Michelle de Araújo Pinheiro, pela realização dos diagnósticos laboratoriais, no Laboratório da Raiva do Centro de Controle de Zoonoses do Crato.

Ao meu cunhado, Josenir Barreto de Sousa, pelas incansáveis ajudas, muito obrigado.

A meus filhos, Pedro Neto, Neilson Filho, Brenno e Luísa, pela compreensão da minha ausência nos momentos importantes de suas vidas.

A minha mãe, irmãs (o), cunhados (a), sobrinhos (a) e amigos, pela solidariedade, apoio, e conformação, por minha ausência nas confraternizações, encontros e momentos importantes da nossa família, pelo amor que tenho a vocês, muito obrigado.

A minha esposa Josimeire Barreto de Sousa Rolim, mais do que nunca, a companheira querida com participação ativa nessa minha trajetória em busca da conclusão desse mestrado, que soube compreender a falta de lazer, de assistência familiar, minha ausência e um aumento de responsabilidades, mesmo assim, nunca me faltou com amor, paciência e incentivo. A você, tenho profundo carinho, amor, respeito e admiração.

À FUNCAP, Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa, sem a qual seria impossível a realização deste experimento.

O AUTOR.

RESUMO

A Raiva é uma zoonose neurotrópica infecto-contagiosa, cuja persistência está relacionada, principalmente, aos cães semi-domiciliados e irrestritos, à baixa imunidade da população canina e reduzida adesão ao diagnóstico laboratorial, devido à dificuldade de coleta e transporte do material utilizado (cérebro). A medula cervical pode ser considerada a porção do sistema nervoso central de acesso mais viável à coleta, transporte e estocagem de amostras destinadas ao diagnóstico da Raiva, em função de sua anatomia e localização, bem como, por ser a via obrigatória de passagem dos vírus, tanto em curso centrípeto quanto centrífugo. Nesse sentido, objetivou-se testar a eficácia da medula cervical como material para o diagnóstico laboratorial da Raiva. Para tanto, utilizou-se uma amostra de tecido nervoso central, isolada de um cão comprovadamente raivoso, cedida pelo Laboratório de Diagnóstico da Raiva do CCZC - CE. Essa amostra foi inoculada via intracerebral em três *Rattus norvegicus* (wistar) e, após o óbito do primeiro animal e confirmação por imunofluorescência direta (IFD) para Raiva, seu cérebro e medula cervical foram macerados em NaCl 0,9%, filtrados em gazes. As suspensões virais obtidas foram inoculadas via intramuscular na face interna da coxa de cinco ratos, respectivamente. Após o óbito dos animais, os cérebros e as medulas foram macerados, filtrados e inoculados via intracerebral em dois grupos respectivos de 25 animais cada, sendo realizada IFD dos animais para confirmação da Raiva. Todos os animais inoculados com as suspensões virais, obtidas tanto do cérebro quanto da medula cervical e inoculados via intramuscular ou intracerebral, evoluíram para óbito e foram positivos para Raiva pela IFD, evidenciando que medula cervical é tão eficaz quanto o cérebro para ser utilizada como material de eleição no diagnóstico de rotina da Raiva.

Palavras-chave: Raiva; diagnóstico laboratorial; medula cervical.

ABSTRACT

Rabies is a neurotropic zoonosis infectum-contagious, whose persistence is mainly related to the street dogs, low immunity of the dog population and reduced adhesion to the laboratorial diagnosis, due to difficulty of collection and transport of the used material (brain). The cervical medulla can be considered the portion of the central nervous system of more viable access to the collected, has carried and stockage from samples destined to the rabies diagnosis, in function of its anatomy and localization, as well as, for being the compulsory way of the viruses, as much centrifugal course as centripetal course. This work was carried out with the aim to evaluate the effectiveness of the cervical medulla as material for the rabies laboratorial diagnosis. Used a brain tissue from rabid dog was isolated, gave for the Center of Zoonosis Control of the Ceará, Brazil. This sample was intracerebral inoculated in three *Rattus norvegicus* (wistar) and after the death of the first animal and confirmation for direct fluorescent antibody test (IFAT), its brain and cervical medulla were macerated in NaCl 0.9% and filtered. The viral suspensions were intramuscular inoculated in the internal face of the thigh of five rats, respectively. After the death of the animals, the brains and the medullas were macerated, filtered and intracerebral inoculated in two respective groups of 25 animals each, being carried through IFAT of the animals for confirmation of the Rabies. All the animals inoculated with the viral suspensions with brain or medulla cervical and by intramuscular or intracerebral inoculated, death and they were positive for rabies for the IFAT, evidencing that cervical medulla is so efficient how much the brain to be used as material of election in the routine diagnosis of the rabies.

Key-works: Rabies; laboratorial diagnosis ; cervical medulla (spinal cord).

SUMÁRIO

<u>LISTA DE FIGURAS.....</u>	<u>XIII</u>
------------------------------	-------------

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Abordagem Histórica.....	19
2.2 Caracterização Epidemiológica	23
2.3 Aspectos Microbiológicos	

<u>Cronograma de Execução, Inoculados dos Subgrupos 3 e 4.....</u>	<u>92</u>
<u>ANEXO C</u>	<u>93</u>
<u>Cronograma de Execução, Inoculados dos Subgrupos 5 e 6.....</u>	<u>93</u>
<u>ANEXO D</u>	<u>94</u>
<u>Cronograma de Execução, Inoculados dos Subgrupos 7 e 8.....</u>	<u>94</u>
<u>ANEXO E</u>	<u>95</u>
<u>Cronograma de Execução, Inoculados dos Subgrupos 9 e 10.....</u>	<u>95</u>

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Ciclos epidemiológicos da Raiva.....	23
.....	31
FIGURA 02: FILOGENIA DO GÊNERO LYSSAVIRUS.....	31
FIGURA 03: DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DOS GENÓTIPOS DE LYSSAVIRUS.	32
FIGURA 04: VÍRUS DA RAIVA VISTO AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO.....	34
FIGURA 06: PROTEÍNAS DO GENOMA DOS VÍRUS DA RAIVA.....	35
FIGURA 07: GENOMA DOS RABDOVÍRUS.	37
.....	38
FIGURA 08: VÍRUS DA RAIVA: A - CORTE LONGITUDINAL E B - CORTE TRANSVERSAL.....	38
Fonte: Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2004.....	38
FIGURA 09: REPLICAÇÃO VIRAL NA CÉLULA.....	39
FIGURA 10: TRAJETO DOS VÍRUS DA RAIVA A PARTIR DO PONTO DE INOCULAÇÃO	47
Fonte: Bingham, 2002.....	47
FIGURA 11: CORPÚSCULOS DE NEGRI.....	49
FIGURA 12: SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	58
FIGURA 13-A: SELLERE.....	59
FIGURA 13-B: IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	59
FIGURA 13-C: INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL.....	59
FIGURA 14: PROVA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD).....	60
FIGURA 15: PROVA DE INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL (IC).....	60
Rolim et al. (2006) demonstraram que a reduzida procura pelo diagnóstico laboratorial da raiva deve-se ao complicado envio das amostras, cujas dificuldades estão relacionadas com a coleta do cérebro, acondicionamento e transporte dos animais inteiros, ou cabeças para o laboratório.....	60
Contudo, o diagnóstico laboratorial da Raiva é de fundamental importância, e seus resultados subsidiam a vigilância epidemiológica para que possam ser definidas as ações de prevenção e controle da doença (ROLIM et al., 2006).	60
FIGURA 16: PRINCIPAIS MEDIDAS PARA UM PROGRAMA DE CONTROLE DA RAIVA	61
FIGURA 17: COLETA DO CÉREBRO DE RATTUS NORVEGICUS (WISTAR).	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ABL: Lissavírus de Morcegos Australianos

ACL: Acetilcolina

CCZ: Centro de Controle de Zoonoses

CDC: Center for Disease Control (Centro de Controle de Doenças)

CVS – Standard Virus Challenge

EBL: Lissavírus de Morcegos Europeus

ELISA: Ensaio de imunoabsorção ligado a enzimas

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária.

EUA: Estados Unidos da América

FAVET – Faculdade de Veterinária.

FUNASA: Fundação Nacional de Saúde

IC: Inoculação intracerebral

IFD: Imunofluorescência Direta

IM: Intramuscular

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

MS: Ministério da Saúde

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde

Pc: Período clínico

PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

PI – Período de Incubação

PMC – Período médio clínico da doença

PMI - Período médio de incubação

PNPR – Programa Nacional de Profilaxia da Raiva

PPGCV – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias

RBN: Ribonucleoproteína

RER: Retículo Endoplasmático Rugoso

RNA: Ácido Ribonucléico

RNAm: Ácido Ribonucléico mensageiro

RNP: Complexo Ribonucleoproteína

RREID: Imunodiagnóstico Enzimático Rápido da Raiva

RT: Transcriptase Reversa

SESA-CE: Secretaria da Saúde do Estado do Ceará

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Periférico

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

UE: União Européia.

UECE: Universidade Estadual do Ceará.

VRG: Glicoproteína do Vírus Rábico

1 INTRODUÇÃO

A Raiva é uma doença infecto-contagiosa, causada por vírus neurotrópicos que atuam no sistema nervoso central (SNC), produzindo uma encefalomielite aguda e fatal, decorrente de sua replicação com conseqüente destruição das células do sistema nervoso (TORDO et al., 1998), provocando freqüentemente alterações comportamentais e motoras, tais como: inquietação, fúria, agressividade, paralisia dos membros posteriores, mandíbula e da epiglote (PENA et al., 1998).

Os primeiros relatos sobre a Raiva humana ocorreram no século XXIV a.C., tornando-se rapidamente conhecida por sua apresentação clínica e letalidade, porém, os primeiros estudos científicos sobre o agente datam do início do século XVIII com a demonstração da natureza infecciosa da saliva de animais raivosos. Ainda neste mesmo século, Louis Pasteur realizou importantes descobertas sobre a doença e sua prevenção através da vacina. Desde então, a doença tem sido exaustivamente estudada, permitindo assim, o desenvolvimento de medidas eficientes de prevenção e controle (MORENO, 2002).

De acordo com a Fundação Nacional de Saúde - FUNASA (1998), a Raiva está presente em todos os continentes, e por falhas na adoção de medidas de prevenção e controle, apresenta-se de forma endêmica na maioria dos países da África e Ásia. Na saúde pública, a Raiva é tida como uma grave zoonose, sendo classificada conforme seu ciclo epidemiológico e seu mecanismo de transmissão, em Raiva urbana, silvestre e rural. Destes, o mais preocupante é o ciclo urbano, onde o cão se destaca como principal transmissor da doença aos seres humanos (ROLIM, et al., 2006).

A Raiva humana transmitida por cães está controlada nos países desenvolvidos, no entanto, apresenta uma alta prevalência na América Latina, aonde em 1982 registrou 355 casos de Raiva humana. Preocupada com este elevado número de casos, a Organização Panamericana de Saúde - OPS coordenou o compromisso político assumido pelos países da América Latina em 1983, de eliminar a Raiva humana transmitida por cães, com meta para 2005. Embora não tenham alcançado o compromisso, conseguiu nesses últimos 20 anos subseqüentes, uma diminuição para 35 casos (2003), o que representou uma redução de 91% do número de óbitos por Raiva. Destes, 27 (77%) foram transmitidos por cães, e ocorreram em seis países da América Latina (OPS, 2005).

O Brasil participou do compromisso político firmado com a OPS em 1983, mas, com a mesma preocupação, antecedeu-se, e em 1970 implantou "O Programa Nacional de Profilaxia da Raiva – PNPR", com o objetivo de erradicar a Raiva em humanos e controlar nos animais. Mesmo não tendo alcançado os objetivos, registrou nos anos de 1990 e 2003, uma diminuição de 43 para 17 casos, correspondendo uma redução de 60% do número de óbitos por Raiva. Apesar desta redução, 14 casos (82%) foram transmitidos por cães, correspondendo a 51,85% dos casos transmitidos por cães na América Latina (OPS, 2005).

A persistência da Raiva humana está sempre associada à baixa imunidade dos animais domiciliados, a superpopulação de cães abandonados nas ruas, e à falha ou falta de um sistema de vigilância epidemiológica. Que segundo a OPS (2005), para esta vigilância ser atuante, bastaria enviar anualmente 0,1% de amostras da população canina para o diagnóstico laboratorial da Raiva, cujas dificuldades estão relacionadas com a coleta do material (cérebro, cabeça, animal inteiro), acondicionamento, e transporte destas amostras para o laboratório.

Apesar da concordância entre o cérebro e a medula cervical quanto à presença de antígenos rábicos e da facilidade de coleta da medula cervical. Estudos devem ser realizados em outros modelos animais, em especial em cães, para com segurança propor a utilização da medula cervical como material para o diagnóstico

laboratorial da Raiva, contribuindo de forma significativa com a vigilância epidemiológica da doença e conseqüentemente com o seu controle.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Abordagem Histórica

A Raiva tornou-se rapidamente conhecida em todo mundo pelo sofrimento causado as pessoas acometidas e pela certeza de sua invariável evolução para a morte (ROLIM, et al 2006). Através dos séculos foram registradas várias descrições da doença, inclusive, tratamentos aplicados a humanos doentes, assim como, medidas básicas de prevenção e controle (SILVA, 2000).

A primeira descrição da Raiva foi feita por Homero em 500 a.C. No século IV a.C., Demócrito relatou a forma clínica da Raiva e Aristóteles escreveu a “História Natural dos Animais” aonde definiu a Raiva em cães e sua transmissão por mordedura. Em Roma (entre os séc. IV-I a.C.), Cornelius Celsus determinou como tratamento preventivo, a sucção dos ferimentos provocados por mordeduras de cães raivosos, através de ventosa ou da boca, como também a cauterização, utilizando produtos cáusticos ou ferro em brasa; estes agredidos bebiam vinho por ser considerado um antídoto contra vários venenos e Galeno a excisão cirúrgica das feridas (SCHNEIDER e SANTOS-BURGOA, 1994).

No século XVI d.C. Girolamo Fracastoro mostrou o princípio de “lesão incurável”, pois a doença inevitavelmente levava à morte. Até a Idade Média, as epidemias por Raiva eram raras, e a maioria dos casos ocorria por mordidas isoladas de cachorros, lobos e raposas, já que morcegos hematófagos só existem nas Américas (MORENO, 2002).

No ano de 1206, o livro das leis de Howel de Gales, destaca o relato de um surto de Raiva canina na Grã-Bretanha, porém, o primeiro grande surto de Raiva foi descrito em 1271 na França, quando lobos raivosos invadiram cidades e vilas atacando rebanhos e humanos, ocasionando a morte de 30 pessoas. A partir deste, outros sucessivos surtos ocorreram: no ano de 1500 na Espanha, em 1614 na cidade de Paris, em 1700 e de forma epidêmica na maioria dos países europeus. Tendo a primeira grande epizootia de Raiva urbana ocorrido na Itália em 1708 (SCHNEIDER e SANTOS-BURGOA, 1994 *apud* MORAIS, 2003).

Com a finalidade de controlar os avanços da doença, em 1750, a Inglaterra foi o primeiro País a adotar a eliminação de cães errantes. Com o surgimento da Raiva canina na cidade de Londres, no período de 1752 a 1762, foi ordenada a eutanásia de todos os cães com função de guia, incluindo um pagamento por animal morto, originando um massacre destes animais. Em 1763, esta medida foi adotada pela Itália, França e Espanha, onde em Madri, em um dia foram mortos cerca de 90 cães (PALÁCIO, 2003).

Nas Américas, o primeiro registro sobre Raiva aconteceu nos Estados Unidos da América (EUA), na cidade de Boston em 1768, com ocorrência também em outras regiões do país. Em 1783, houve um surto de Raiva em humanos, cavalos e suínos no Haiti e República Dominicana. Em 1789, Galtier comprovou a capacidade contagiosa do tecido nervoso.

A partir de 1800, propagou-se um extenso surto de Raiva silvestre em raposas nos Alpes Ocidentais, com agressões em pessoas, cães, suínos e outros animais, dispersando-se para a França Ocidental, Alemanha, Suíça, Itália, Noruega e Rússia. As raposas com facilidade transmitem Raiva aos cães, tanto que em 1803 o Peru registrou o primeiro surto de Raiva, o qual se estendeu de Norte a Sul por todo país, ocasionando a morte de 42 pessoas; como medida de controle, a autoridade da saúde de sua capital Lima, adotou o sacrifício dos cães, e assim salvou a cidade de uma epidemia (SILVA, 2000).

Zinke, em 1804, citado por SCHNEIDER e SANTOS-BURGOA, 1994, comprovou a infecciosidade da saliva, inoculando-a em cães sadios, esse estudo propiciou até os dias de hoje a prova biológica, largamente utilizada na confirmação do diagnóstico laboratorial da Raiva. Em 1856 ocorreram vários surtos de Raiva humana na Áustria, Hungria e Turquia, todos precedidos por Raiva canina. Em 1869, instalou-se um surto de Raiva em cães em Paris, vitimando várias pessoas, o que motivou ainda mais os estudos de Trosseau, que nesse mesmo ano, descreveu os sintomas da Raiva e levantou a hipótese dela ser causada por um vírus específico e transmitida somente pela mordedura de animais raivosos.

No final do século XIX a Raiva se encontrava disseminada por toda Europa, onde se apresentava como uma grave epidemia em muitas cidades. Pesquisadores da época estudaram a doença tentando compreender o modo de transmissão e o agente causal, em busca de medidas de prevenção e tratamento. Dentre estes, o bioquímico Louis de Pasteur, que havia desenvolvido a vacina contra a cólera e artrose, começou a trabalhar com vírus da Raiva por volta de 1880. Ele fez importantes descobertas sobre a distribuição do vírus em animais infectados, diferença entre a Raiva parálitica e a furiosa, a reprodução da doença em animais experimentais e a dose necessária para desenvolver a infecção. Discutiu a hipótese que o vírus era passado do sistema nervoso periférico (SNP) para o sistema nervoso central (SNC) via nervos e não pela corrente sangüínea, e o mais importante, desenvolveu bases teóricas e experimentais para a imunização de animais e pessoas contra a doença (SCHNEIDER e SANTOS-BURGOA, 1994).

Na era Pasteuriana, de 1881 a 1885, foi divulgado os primeiros informes sobre a Raiva, assim como, a utilização do Sistema Nervoso Central – SNC (medula espinhal) dos animais, através de passagens do vírus de cão para o macaco e do macaco para o macaco, com conseqüente atenuação do vírus e obtenção do vírus “fixo”. Este estudo proporcionou um grande progresso que culminou em 1885, com o desenvolvimento de um método que resultou na vacinação anti-rábica humana (MORAIS, 2003).

Para manter o vírus viável para experimentos em laboratório, Pasteur fazia inoculações seriadas intracerebrais (IC) em intervalos regulares. Ele observou que o período de incubação da doença passava da média de 15 dias, para um período fixo de 5 a 7 dias após certo número de passagens numa mesma espécie. Como esse vírus não era atenuado suficientemente para uso direto em humanos e animais, ele tentou alguns métodos físicos de atenuação. Assim, do coelho onde se realizou a nonagésima ou mais passagens de vírus fixo, era coletado uma amostra de sua medula espinhal e fragmentada em pedaços de aproximadamente 6 cm, os quais eram colocados em frascos contendo soda cáustica (NaOH). À medida que o tecido secava o período de incubação (PI) em coelhos aumentava, e após 15 dias de secagem tornava-se avirulento, podendo com sucesso imunizar cães através de inoculações seriadas por via subcutânea (SC) iniciando com tecido avirulento até tecido fresco. Neste procedimento a quantidade de vírus vivo ia crescendo gradualmente a cada inoculação (SANOFI PASTEUR, 2005).

Os vírus fixos foram utilizados como vacina em humanos no dia 6 de julho de 1885, quando Louis Pasteur com êxito tratou de forma profilática uma criança de 9 anos de idade (Joseph Meister) por ter sido mordida por um cão raivoso. A partir desta imunização foram feitas melhorias nas técnicas de produção das vacinas até chegarem às excelentes vacinas utilizadas atualmente.

Negri, confirmando os trabalhos de Babes (1887), descreveu a presença de corpúsculos de inclusão citoplasmáticos nas células nervosas, que ficaram conhecidos como Corpúsculos de Negri, até hoje utilizados como método de diagnóstico pós-mortem. Em 1903, Remlinger demonstrou a filtrabilidade ou natureza ultrafiltrável do vírus.

No período de 1910 a 1911 Carini descreveu um surto de Raiva em herbívoros em Santa Catarina - Brasil, confirmado através de diagnóstico laboratorial e pela reprodução experimental da doença. Esta descrição possibilitou Haupt

Reehag, no período de 1914 a 1916, comprovar pela primeira vez a presença do vírus da Raiva em morcegos.

Em 1956, os pesquisadores chilenos Fuenzalida e Palácios desenvolveram uma vacina produzida em cérebro de camundongo lactente, um produto biológico muito mais inócuo e potente do que as vacinas até então utilizadas, sendo essa vacina utilizada nos programas de controle da Raiva em diversos países. Dois anos mais tarde, Goldewasser e Kissling (1958) realizaram uma prova de imunofluorescência direta para diagnosticar laboratorialmente o vírus da Raiva.

2.2 Caracterização Epidemiológica

O complexo da Raiva é formado por seus ciclos epidemiológicos (silvestre, urbano e rural), por ser considerado como primeiro, o ciclo silvestre pode ter originado os demais. Neste contexto, distinguem-se duas caracterizações epidemiológicas principais: a Raiva urbana, mantida e transmitida principalmente pelo cão e o gato; e a silvestre, cujos reservatórios e transmissores são os animais silvestres, principalmente os carnívoros e quirópteros (Figura 01). Os carnívoros envolvidos na cadeia de transmissão da doença variam conforme a fauna autóctone, destacando-se por maior envolvimento, os canídeos, felídeos e mustelídeos (PALÁCIO, 2003)

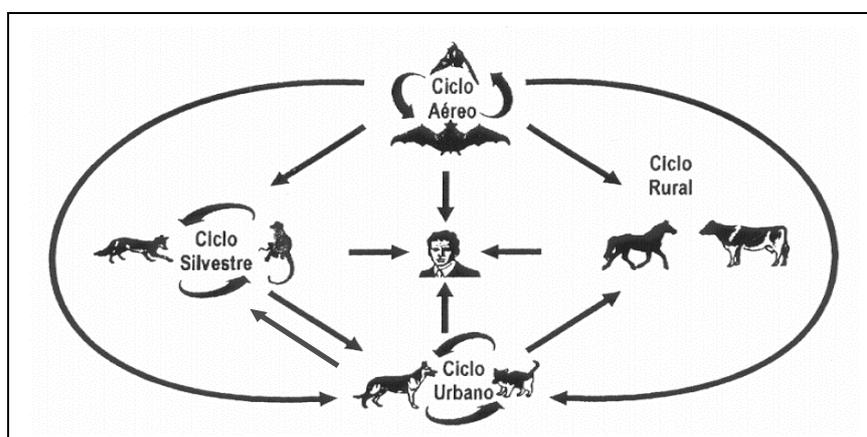


Figura 01: CICLOS EPIDEMIOLÓGICOS DA RAIVA

Fonte: Instituto Pasteur – São Paulo (2002).

A distribuição mundial da Raiva vem ocorrendo ao longo dos séculos em varias espécies de animais domésticos e silvestres, devido à *spillover* do vírus e a suscetibilidade dos hospedeiros. Que também, possibilitam a dispersão da doença com conseqüente ameaça aos seres humanos, constituindo-se em um grave problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento da Ásia, África e América Latina, aonde os principais transmissores são os cães irrestritos (ROLIM, et al 2006).

A distribuição da Raiva animal varia com os aspectos geográficos e as espécies de animais afetadas, de acordo com os países e as regiões, não havendo uma distribuição uniforme nos países infectados, já que em muitos deles existem áreas livres, de baixa e de alta endemicidade (OPAS, 1986). De uma forma geral, a Raiva canina predomina na Ásia, África e América Latina, cujos continentes são responsáveis por 90% dos casos. Porém, a Raiva silvestre, principalmente dos carnívoros, apresenta uma maior incidência nos países da Europa e América do Norte, onde atualmente é responsável por mais de 95% dos casos (BELLOTO, 2001).

Estima-se que a cada ano ocorra a morte por Raiva de aproximadamente 70.000 pessoas em todo mundo (CHÁVEZA, et al., 2006), onde 10 milhões recebem terapia através de imunobiológicos devido a agressões por animais susceptíveis de contrair e transmitir a doença (SANOFI PASTEUR, 2005; MUHAMUDA et al., 2006). Mais da metade da população mundial (cerca de 3 bilhões de pessoas) vive em áreas de risco da doença, e a cada 10 ou 15 minutos, morre uma pessoa por Raiva no planeta (BELLOTO, 2001).

De acordo com A WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO 1996, registra-se em média 35.000 a 55.000 casos de Raiva humana por ano na Ásia, destes, 20.000 ocorrem na Índia e 5.000 na China. Na África, o número de óbitos

oscila entre 5.000 e 15.000. Na Região das Américas registrou-se nas décadas de 70; 80 e 90, a média anual respectiva de 255, 293 e 168 óbitos por Raiva humana. Na América Latina, no período de 1990 a 1999 confirmou-se 1.647 óbitos por Raiva humana, uma média de 165 casos por ano (WHO, 2000).

Atualmente a América Latina apresenta uma grande concentração de Raiva humana transmitida por cães, onde mais de um milhão de pessoas são mordidas por animais raivosos, e destas, morrem em média 200 por ano. No período de 1990 a 2003, ocorreram 71.768 casos de Raiva canina, e 1.835 casos de Raiva humana, destes, 1.215 (66%) foram transmitidos por cães, resultando na proporção de 59 casos caninos para 1 óbito humano. Apesar dos esforços, e do acordo político coordenado pela OPS, para controlar o ciclo urbano da Raiva até 2005. Nesse período, mais de 60% dos Países membros não conseguiram controlar o ciclo urbano da Raiva, destacando-se por apresentar mais de 100 óbitos: o Brasil (412 casos), México (321), Peru (275), Equador (222), Bolívia (121) e El Salvador (104) (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - OPS, 2005).

No Brasil, o ciclo urbano predomina sobre o ciclo silvestre, sendo o cão e o gato as principais fontes de infecção para outras espécies de animais domésticos e seres humanos (ELKHOURY et al, 2002).

O Brasil, no período de 1990 a 2003, foi o país da América Latina que apresentou o maior número absoluto de óbitos por Raiva humana, 412, dos quais, 329 (80%) foram transmitidos por cães, como também, o segundo em Raiva canina, com 11.027 casos, ou seja, uma proporção de 33 casos caninos para 1 (um) óbito humano (OPS, 2005).

O México foi o segundo país da América Latina em número de óbitos por Raiva humana, 321, destes, 237 (74%) foram transmitidos por cães; e o primeiro País da América Latina em número de casos de raiva canina 27.903, o que correspondeu a uma proporção de 118 casos de Raiva canina para 1 (um) óbito por

Raiva humana. No Peru, Equador, Bolívia e El Salvador, esta proporção foi respectivamente de 36; 37; 95; 18 (OPS, 2005).

A qualidade da vigilância epidemiológica da Raiva de um país, estado, ou cidade, pode ser avaliada pela proporção entre os casos de Raiva canina (urbana) e humana; quanto menor for a proporção mais falho (pior) é o sistema de vigilância (ROLIM, 2004).

De acordo com a OMS/OPS (2005), uma área (Estado) é considerada como livre de Raiva, quando por mais de 10 anos não registrar circulação de vírus na população canina, e possuir uma vigilância epidemiológica confiável. Os Estados brasileiros vêm alcançando estágios distintos, no controle da Raiva, acarretando situações epidemiológicas diferentes para o país, onde os números de casos de Raiva humana e canina, bem como, o desenvolvimento das ações de controle, apresentam uma grande variação entre as regiões e seus estados (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FUNASA, 2002).

O Brasil é formado por cinco regiões, Norte, Nordeste, Sudeste, Sul, e Centro-Oeste, as quais, nos anos de, 1986: registraram respectivamente, 10, 22, 1, 0 e 6; em 1995: 9, 12, 7, 0 e 3; e em 2005: 17, 26, 1, 0, 0; óbitos por Raiva humana. Avaliando estes 3 anos, e considerando seus intervalos de 10 anos, pôde-se concluir que, a Raiva humana está controlada apenas na região sul, encontrando-se em processo de controle as regiões sudeste e centro-oeste, enquanto, as regiões Norte e Nordeste apresentaram os maiores índices da doença, e conseqüentemente a maior incidência nestas duas últimas décadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS, 2006).

No período de 2002 a 2005, as regiões Norte, Nordeste, Sudeste, Sul, e Centro Oeste, notificaram respectivamente, 230, 771, 47, 4 e 114 casos de Raiva canina. Os quatro casos notificados na região Sul, ocorreram no Estado do Paraná, sendo, três em 2002, e um em 2005. Esta avaliação mostra que a Raiva canina não

está controlada em nenhuma região brasileira, e que a região Nordeste apresenta a maior concentração da Raiva canina (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - SVS, 2006).

Na região Nordeste do Brasil no período de 2002 a 2005, confirmaram-se em laboratório, os seguintes casos de Raiva canina nos respectivos estados: (70) no Maranhão, (11) no Piauí, (175) no Ceará, (3) no Rio Grande do Norte, (24) na Paraíba, (203) em Pernambuco, (17) em Alagoas, (25) em Sergipe e (247) na Bahia, o que indica uma elevada circulação da doença em cães, principalmente nos estados da Bahia, Pernambuco, Ceará e Maranhão. Estes quatro estados, atualmente, possuem a maior concentração de Raiva canina, como também, a maior incidência de Raiva humana transmitida por cães no Brasil, constituindo-se em uma área de alto risco para a Raiva (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA A SAÚDE - SVS, 2006).

O Estado do Ceará liderou os casos de Raiva humana no Brasil no período de 1980 a 1985, sendo o cão responsável por 87% da transmissão dos mesmos (MORAIS et al. 1996). Assumindo novamente esta liderança nos anos de 1989, e 2003, quando registrou respectivamente 8 e 7 óbitos por Raiva humana, os quais, (100%) foram transmitidos por cães, evidenciando a importância destes animais como reservatório e transmissores da doença aos seres humanos no estado do Ceará (SECRETARIA DE SAÚDE-CE, 2004).

A Raiva é tida como um dos grandes e graves problemas de saúde pública, particularmente das grandes cidades de países pouco desenvolvidos, onde a transmissão ocorre em subúrbios ou áreas metropolitanas com elevada densidade de cães vadios (WIDDOWSON et al., 2002). Dentro deste perfil, o estado do Ceará notificou no período de 1999 a 2003, a ocorrência 12 óbitos por Raiva humana transmitida por cães, sendo, (4) em Fortaleza e (8) na área metropolitana.

Notificações semelhantes foram registradas em Shandong (uma província no Leste da China), onde de janeiro a setembro de 2006 ocorreram 16 óbitos por Raiva humana, destes, nove foram na região metropolitana de Beijing, cidade da China aonde as pessoas foram atendidas após contraírem a doença na área metropolitana, evidenciando a importância desta área na manutenção da doença (PROGRAM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES - PROMED, 2006).

As áreas com maior concentração de casos de Raiva humana transmitida por cães, encontram-se nas periferias das grandes cidades, como, Porto Príncipe no Haiti, Salvador em São Salvador e Fortaleza no Brasil. Esta elevada transmissão é proporcional à circulação dos vírus da Raiva nas grandes populações de cães existentes nas ruas destas cidades sem que sejam vacinados (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2005).

No período de 1990 a 2003, o estado do Ceará, e sua capital Fortaleza, notificaram respectivamente 40 e 15 óbitos por Raiva humana, destes, 27 (67,5%) e 15 (100%) respectivamente foram transmitidos por cães. Através destes resultados, Fortaleza se destacou como a cidade que apresentou a maior porcentagem de Raiva humana transmitida por cães na América Latina (ROLIM, 2006).

2.3 Aspectos Microbiológicos

Na saúde pública a Medicina Humana e Veterinária possuem grande importância, pois a maioria dos agravos e das doenças é transmitida aos seres humanos pelos animais, cujos agentes etiológicos podem ter como hospedeiros (intermediário ou definitivo) tanto o homem quanto os animais. Mesmo alguns agentes sendo espécie-específica, suas caracterizações bioquímicas e sorológicas são feitas através dos mesmos testes laboratoriais, fazendo com que a microbiologia

humana e veterinária avancem juntas no mundo científico, que utiliza como principal modelo os animais (PALÁCIO, 2003).

Os vírus da Raiva pertencem à Ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae. Esta família é composta por cinco gêneros: *Novirhabdovirus de peixe*, *Cytorhabdovirus de planta*, *Vesiculovirus*, relacionado com doença vesicular em animais, *Ephemerovirus*, relacionado com a febre efêmera dos bovinos; e *Lyssavirus*, relacionado com a encefalomielite fatal em mamíferos, onde abriga mais de 200 cepas, cujos hospedeiros variam entre vertebrados, invertebrados e plantas, podendo causar a estes várias doenças. Analisadas em microscopia eletrônica todas têm uma estrutura física bastante semelhante entre si e possuem muitas propriedades em comum. Algumas isoladas de invertebrados ainda não foram classificadas (TORDO et al., 1998). Os vírus da Raiva pertencentes ao gênero *Lyssavirus* são os únicos a infectar mamíferos, exceto os aquáticos, tais como: baleia, golfinho, foca, leão marinho, morsa e peixe boi (ROLIM, et al, 2006).

Os vírus da Raiva em sua forma natural são denominados vírus de rua ou vírus selvagens, por existirem na natureza. Estes são muito patogênicos e têm afinidade por células nervosas, pelo epitélio respiratório e por tecido glandular seromucoso. Seu isolamento é feito a partir de animais infectados em ciclos de transmissão natural, cujo período de incubação é variável e prolongado, caracterizando-se por invadir o cérebro e glândulas salivares induzindo a formação de corpúsculos intracitoplasmáticos (corpúsculos de Negri) no interior dos neurônios (VERONESI e FOCACCIA, 1997).

A cepa conhecida como "vírus fixo ou fixado", é obtida através da replicação em laboratório dos vírus de rua por passagens seriadas intracerebrais, com conseqüente seleção de subpopulação de vírus com virulência definida. A cepa não patogênica possui período de incubação mais curto, entre 4 e 7 dias, relativamente estável, perde a capacidade de infectar as glândulas salivares e não produz corpúsculos de Negri (VERONESI e FOCACCIA, 1997).

As cepas virais eram diferenciadas por sua patogenicidade, pela sensibilidade dos animais inoculados, e principalmente, pela titulação em camundongos. Desse modo, as cepas de Raiva natural como vírus silvestres, ou de rua, foram diferenciadas das cepas de vírus modificado ou fixo (ACHA e SZYFRES, 1986).

Até o início da década de 70 consideravam-se os vírus da Raiva como uma única unidade antigênica. Com os estudos dos anticorpos monoclonais e soro-neutralização, os *Lyssavirus* foram subdivididos em 4 sorotipos: Sorotipo 1 - linhagens de vírus rábico clássico; Sorotipo 2 - vírus Lagos Bat; Sorotipo 3 - vírus Mokola; e o Sorotipo 4 - vírus Duvenhage (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990).

Atualmente o Gênero *Lyssavirus* abriga sete sorotipos, onde o sorotipo 1 - vírus clássico da Raiva, ao contrário do que se relatava, este não se constitui apenas em uma unidade antigênica, pois apresenta variantes conforme a espécie animal, a região ou país proveniente (TORDO et al., 1998).

No continente americano foram detectadas pela World Health Organization - Atlanta/EUA, 12 cepas variantes deste sorotipo (1), através da técnica de anticorpos monoclonais. Os demais sorotipos (2 a 6) foram isolados na Europa e África, os quais foram denominados de vírus aparentados ou relacionados aos vírus da Raiva. Em 1995 e nos anos seguintes foi isolado na Austrália, tanto em morcegos como em humanos, um vírus que ainda se encontra em estudo, considerado por alguns pesquisadores como o sorotipo 7 (King 2001 *apud* Tordo et al 1998).



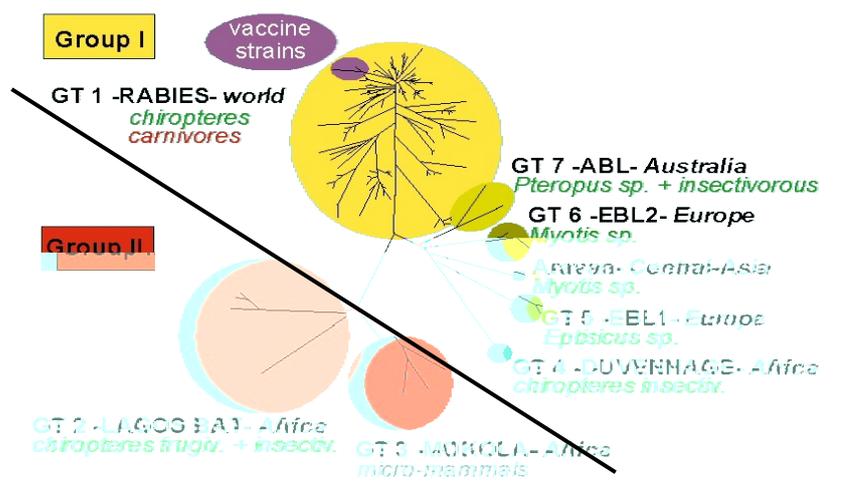


FIGURA 02: FILOGENIA DO GÊNERO LYSSAVIRUS

Fonte: Tordo, 2006

Através dos estudos com anticorpos monoclonais, e da soro-neutralização, pode-se classificar os seguintes sorotipos de *Lyssavirus* (Figura 2): Tipo 1 - Clássico, consiste na cepa CVS (*Standard Virus Challenge*), e na maioria das cepas silvestres e de laboratórios de várias regiões do mundo, sendo que a este sorotipo pertencem todas as cepas isoladas até o momento na América do Sul; Tipo 2 - Lagos Bat, isolado em 1956, originariamente de cérebro de morcegos frugívoros (*Eidolon helvum*), na Ilha Lagos da Nigéria (sem caso humano); Tipo 3 - Mokola, isolado em 1968, de um roedor na Nigéria (sem caso humano), somente em 1970 foi classificado como sorotipo; Tipo 4 - Duvnhage, isolado de um homem mordido por um morcego insetívoro na África do Sul, em 1970; Tipo 5 - (EBLV-1) Lissavírus Europeu 1 (morcego), isolado de um caso humano na Rússia, identificado em 1985; Tipo 6 - (EBLV-2) Lissavírus Europeu 2 (morcego), isolado de um caso humano na Finlândia, identificado em 1985 (Bourhy, et al., 1993); e por último o Tipo 7 - (ABLV) Lissavírus Australiano isolado em morcego responsável por caso humano (WARRILOW et al., 2002).

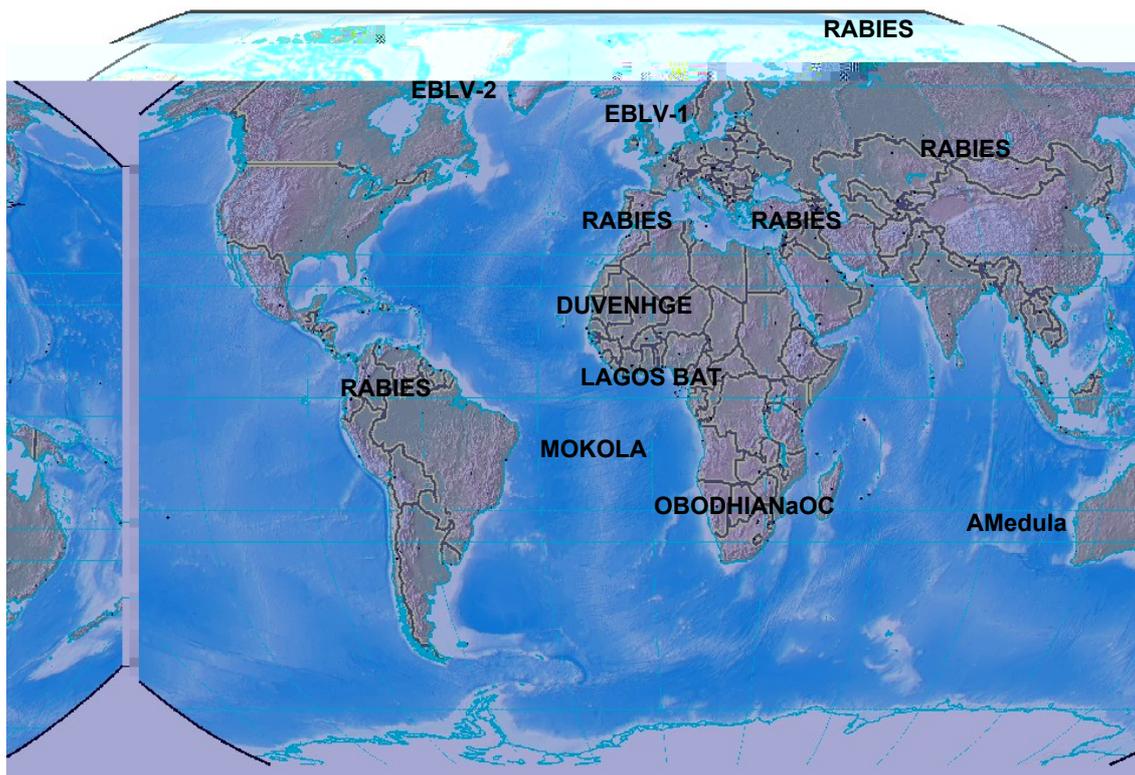


FIGURA 03: DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DOS GENÓTIPOS DE LYSSAVIRUS.

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention-CDC, Atlanta, 2004

Através de um caso isolado de Raiva humana transmitida por morcego, foi possível relatar a primeira seqüência completa dos vírus ABL – Australian Bat Lyssavirus, a partir de amostra do SNC de uma pessoa que desenvolveu sintomas compatíveis com os da Raiva, após 27 meses de ter sido mordida por um morcego infectado, confirmando-se assim, a relação fechada com o vírus rábico clássico (WARRILOW et al., 2002).

O sorotipo 1 dos vírus da Raiva possui distribuição geográfica praticamente mundial, tendo sido isolado em quase todos os países do globo (Figura 03). Contudo, os sorotipos 2, 3, 4, 5, e 6 possuem ampla distribuição na África e na Europa, porém, registros na literatura confirmam o isolamento do sorotipo 4 em morcegos frugívoros na Europa Central, constituindo até hoje uma preocupação para as autoridades da saúde (ATANASIU e SUREAU, 1987).

A ocorrência da cepa *Duvenhage* (sorotipo 4) na Europa, conduziu estudos visando o desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais que identificassem e diferenciassem os sorotipos das amostras infectadas pelos vírus da Raiva, como resposta, destacou-se o teste rápido de diagnóstico imunoenzimático para Raiva RREID - Rapid Rabies Enzyme Immuno-Diagnosis Test, (RUPPRECHT, 1992).

Com a exceção do sorotipo Lagos Bat, o qual não tem sido isolado de seres humanos, todos os vírus da Raiva, incluindo os aparentados (relacionados) são patogênicos para mamíferos, inclusive humanos, e podem levar à encefalite rábica (KING e CRICK, 1988).

Os carnívoros, que constituem os principais reservatórios do vírus rábico, apresentam a tendência de se agregarem em relação às outras espécies, tornando as agressões intra-espécies mais comuns do que as inter-espécies, levando a uma circulação mais intensa do vírus rábico dentro de uma determinada espécie. Esse isolamento faz com que certas mutações no genoma viral fiquem compartimentalizadas em determinadas espécies reservatórios levando à formação de cepas (ACHA e SZYFRES, 1986; MORENO, 2002; PALÁCIO, 2003).

As cepas virais eram inicialmente diferenciadas por sua atividade patogênica, pela resposta da sensibilidade de animais inoculados, e principalmente, pela titulação em camundongos. Desse modo, as cepas de vírus silvestres ou vírus de rua eram diferenciados das cepas de vírus modificados ou vírus fixo, obtidas após passagens seriadas do vírus silvestre *in vivo*, *in ovo* ou *in vitro* (ACHA e SZYFRES, 1986).

A variabilidade dos vírus da Raiva contrasta fortemente com sua notável similaridade na morfologia, estrutura, e mecanismos de replicação. No microscópio eletrônico os vírus da Raiva são vistos sob a forma de bastonetes cilindrogivais, ou forma de projétil (bala de revólver), com uma das extremidades arredondada e a

outra formando ângulo reto, como pode ser observado na figura 4. São vírus RNA de ... capas de natureza lipídica, (TORDO et al., 1998).

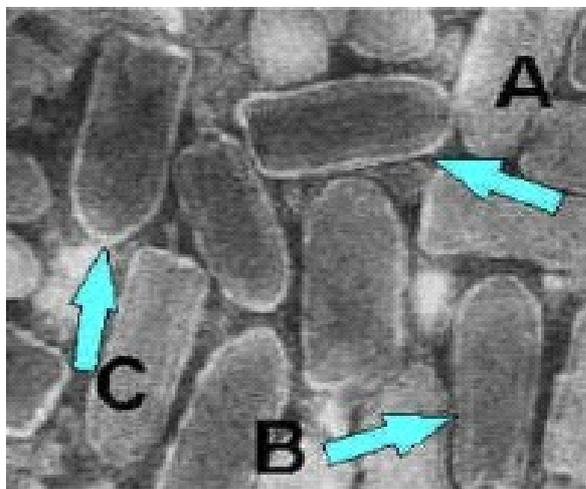


FIGURA 04: VÍRUS DA RAIVA VISTO AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO.

A - Formato de projétil. B - Estrias de ribonucleoproteína. C - Espículas de glicoproteína.

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention-CDC, Atlanta, 2004.

Os rhabdovírus possuem aproximadamente 180 nm de comprimento por 75 nm de largura, e são compostos por: 74% de proteína, 22% de lipídeos, 3% de carboidratos e 1% de RNA (composição dependente da célula hospedeira) (Figura 05).

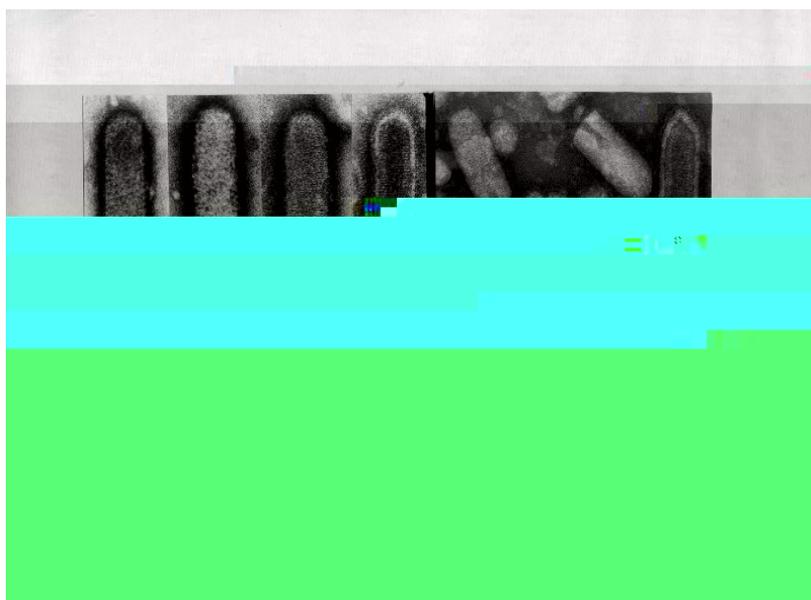


FIGURA 05: DIMENSÕES DOS VÍRUS DA RAIVA

Fonte: Tordo, 2006. Instituto Pasteur, Paris.

Os avanços registrados em biologia molecular possibilitaram, em 1981, o relato da primeira seqüência dos genes dos vírus da Raiva, como também, estabeleceram as bases para sua classificação definitiva, mediante a análise antigênica comparativa. Do mesmo modo, foi possível identificar a estrutura molecular, e codificar o genoma viral, estabelecendo a correlação entre as seqüências do ácido nucléico primário e aminoácidos, as propriedades biológicas e imunológicas do vírus rábico (WUNNER, 1992).

Através da biologia molecular, pode-se codificar as cinco proteínas do genoma rábico, e determinar a extensão total do nucleotídeo dos genes estruturais: nucleoproteína (**N**), fosfoproteína (**P**), matriz protéica (**M**), glicoproteína (**G**), transcriptase (**L**), como também, descrever suas estruturas e funções (Figura 06); mapear e definir os sítios antigênicos; reconhecer as exigências estruturais necessárias para a atividade imunogênica; constatar as diferenças de qualidade entre antígeno solúvel e a glicoproteína inteira; identificar as regiões imunogênicas essenciais para a indução de anticorpos neutralizantes; e comprovar que fragmentos de peptídeos podem ser utilizados como determinantes antigênicos para linfócitos B e T (BOURHY et al., 1990; TORDO et al., 1998).

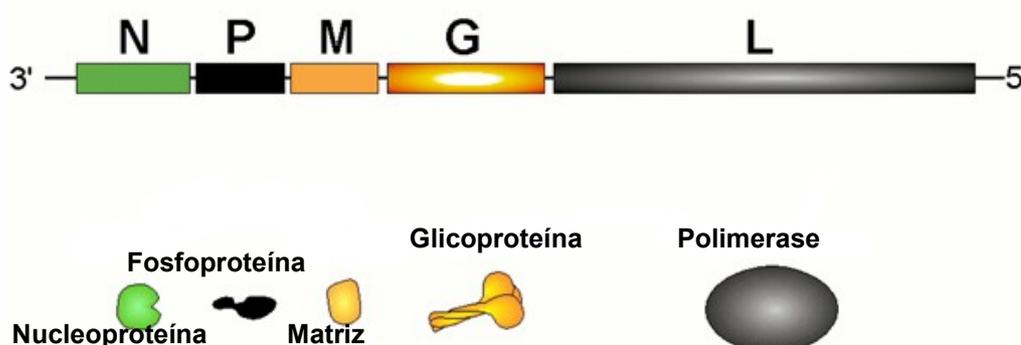


FIGURA 06: PROTEÍNAS DO GENOMA DOS VÍRUS DA RAIVA

Fonte: Tordo, 2006. Instituto Pasteur, Paris.

As pesquisas efetuadas com base na biologia molecular têm sido de relevante importância, não só para complementar os conhecimentos sobre a patogênese da infecção rábica e a imunologia, como também, para a determinação da variabilidade genética do vírus da Raiva, inclusive entre cepas, e para o esclarecimento dos mecanismos de replicação e transmissão viral (WUNNER, 1982).

Os rbdovírus apresentam polaridade negativa com genoma não segmentado, sendo composto estruturalmente por duas unidades: a ribonucleoproteína (RBN) – cilindro central de 50 nm de diâmetro, de simetria helicoidal; e o envelope viral – membrana lipoprotéica de 8nm de espessura, constituída de membrana celular e por partículas de glicoproteína de 10 nm de comprimento que se projetam sobre esta membrana (TORDO et al., 1998).

A glicoproteína (G) do envelope viral é a mais importante, por ser considerada o antígeno capaz de induzir a síntese de anticorpos neutralizantes, conferindo proteção à doença e responsável pela absorção vírus-célula (Figura 07) (TORDO, 2006).

Glicoproteína

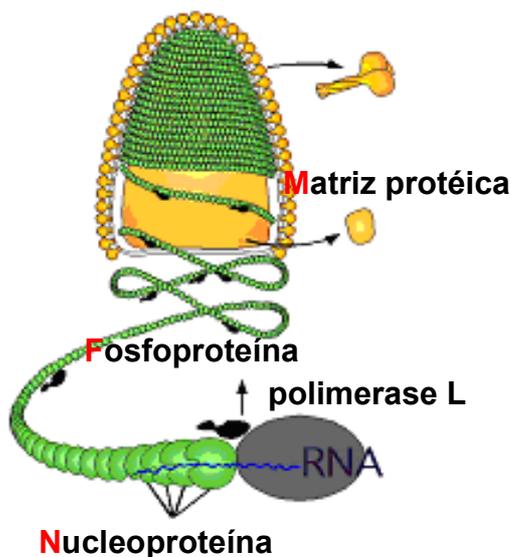


FIGURA 07: GENOMA DOS RABDOVÍRUS.

Fonte: Tordo, 2006. Instituto Pasteur, Paris.

Todos os rhabdovírus possuem duas estruturas principais: uma ribonucleoproteína central helicoidal (RNP) e um envelope envoltório (Figura 08). Na RNP, o RNA genômico é firmemente ligado à nucleoproteína. Duas outras proteínas virais, a P, e a proteína maior (ou polimerase L) estão associadas à RNP. A proteína G, que forma o envelope, possui aproximadamente 400 espículas trimétricas, que se encontram firmemente aderida à superfície do vírus. A proteína M está associada ao envelope e à RNP e provavelmente pode ser a proteína central da montagem do rhabdovírus.

Ao corte longitudinal (Figura 8-A), podem-se observar as camadas concêntricas: membrana do envelope, proteína M e o RNA firmemente condensado, e na (Figura 8-B), corte transversal, destacam-se as trimeres do vírus, formadas por glicoproteínas (TORDO et al, 1998).

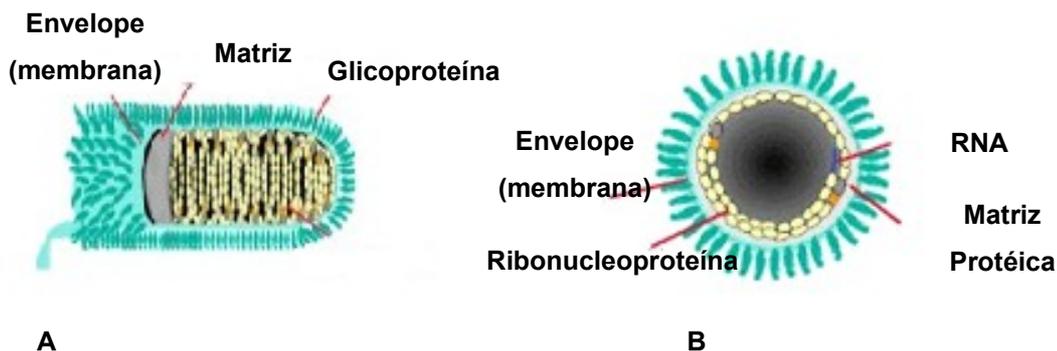


FIGURA 08: VÍRUS DA RAIVA: A - CORTE LONGITUDINAL E B - CORTE TRANSVERSAL.

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2004.

2.3.1 Ciclo Infeccioso do Vírus na Célula

Acredita-se que a ligação do virion na membrana das células susceptíveis é mediada pelas trimères das glicoproteínas, que reconhecem receptores específicos (COLL, 1995).

Vários estudos indicam que os receptores nicotínicos da acetilcolina (AChR) são receptores para partículas de Lyssavirus (BAER *apud* TORDO et al., 1998).

A replicação dos vírus da Raiva é restrita, quase exclusivamente ao tecido nervoso (Figura 09). O vírus multiplica-se no local da inoculação, em músculo estriado, permanecendo no local por dias ou meses, antes de passar aos nervos periféricos. A progressão do vírus para o Sistema Nervoso Central (SNC), denominada de *via centripeta*, é modulada pela: concentração do vírus no inóculo inicial, proximidade da lesão com o cérebro, gravidade da ferida (profunda, múltiplas, dilacerantes), idade e estado imunológico do hospedeiro. Até o momento não foi documentado nenhum estágio virêmico significativo (MORENO, 2002).

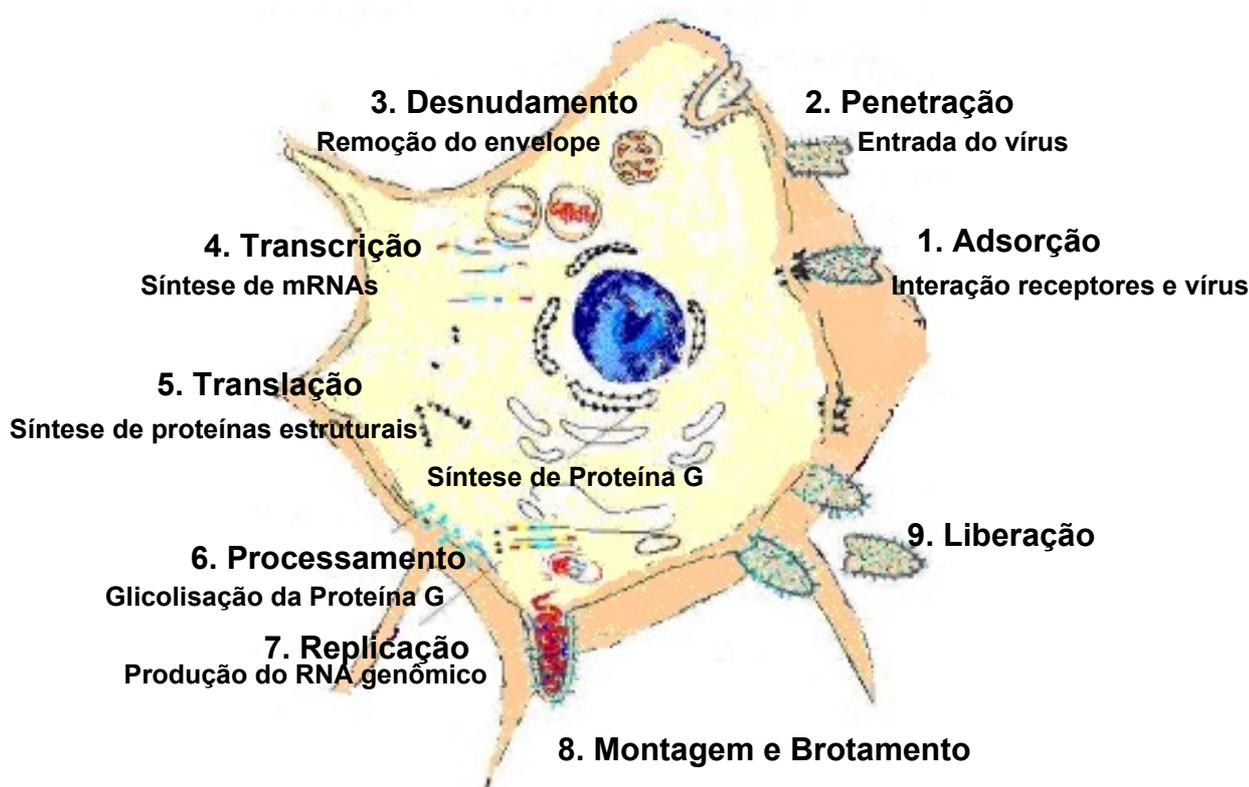


FIGURA 09: REPLICACÃO VIRAL NA CÉLULA.

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2004.

Os fusos neuromusculares (placas mioneurais) servem como uma porta de entrada do vírus da Raiva para os nervos sensoriais periféricos. Por onde seguem através das bainhas mielínicas até infiltrar-se na medula espinhal. Uma vez na medula espinhal segue rapidamente determinando a infecção do cérebro. As áreas afetadas incluem o hipocampo, tronco cerebral, bulbo, cérebro, cerebelo, células ganglionares dos núcleos pontinos e células de Purkinje do cerebelo. O vírus dissemina-se do SNC através dos neurônios aferentes para locais altamente inervados, como a pele da cabeça e pescoço, glândulas salivares, retina, córnea, mucosa nasal, medula supra-renal, parênquima renal, e células acinares pancreáticas. Esta disseminação é denominada via centrífuga (MORENO, 2002).

Acredita-se que os receptores das células susceptíveis reconhecem as trimeres das glicoproteínas, ocorrendo assim a ligação, através da qual o vírus é

conformação inativa para a fusão, enfraquecendo essas interações com a membrana viral durante o transporte. Uma vez na superfície celular, o pH aumenta e a conformação é revertida para a forma natural (TORDO et al., 1998).

Antes da germinação viral, a transcrição e a replicação são inibidas, e simultaneamente, a RNP torna-se intensivamente condensada e enrolada. Ao mesmo tempo, as glicoproteínas são condensadas em regiões particulares da membrana plasmática. Evidências sugerem que esse papel morfológico durante a montagem do vírus é feito pela matriz protéica. Após a parada da maturação citoplasmática, o vírion deixa a célula por germinação, o envelope lipídico sendo provido pela membrana da célula hospedeira (TORDO et al., 1998).

2.3.2 Propriedade Antigênica

O vírus da Raiva apresenta dois antígenos principais: um antígeno interno constituído por uma nucleoproteína a qual é grupo-específica, e um antígeno externo ou de superfície, constituído por uma glicoproteína responsável pela formação de anticorpos neutralizantes. Os anticorpos que correspondem à nucleoproteína podem ser detectados por fixação de complemento, imunofluorescência, gel-precipitação, reações imunoenzimáticas, etc., e podem servir para identificação do vírus, porém não parece que tenham ação protetora. A glicoproteína, ao invés, é responsável pela formação de anticorpos neutralizantes. O vírus não possui hemaglutinina (KNIPE et al., 2001).

A resposta imune contra os *Lyssavírus* é complexa, sendo a resposta para o vírus da Raiva extensivamente estudada. Embora todas as proteínas virais sejam antigênicas, o papel delas na proteção é diferenciado (XIANG e SPITALNIK, 1995). As respectivas importâncias têm sido descritas pela técnica de DNA recombinante. Duas destas proteínas, a G e N, apresentam uma importância primária, já a fosfoproteína M1 é menos significativa. As propriedades da proteína G

dependem da preservação da estrutura tridimensional, embora um epítipo linear neutralizante tenha sido identificado. Por outro lado, porções da glicoproteína com as proteínas N e M1 da RNP induzem a resposta celular, envolvendo respectivamente células T helper (Th) e células T citotóxicas (Tc) (TORDO et al., 1998).

2.3.3 Resistência e Conservação

O vírus rábico é inativado por diversos agentes físicos como radiação ultravioleta, raios X, calor, luz solar, dessecação, pasteurização, e agentes químicos como detergentes e sabões, álcalis, bicloreto de mercúrio, desoxicolato de sódio, fenol, éter, acetona, álcool, compostos iodados, formol, ácidos com pH < 3 e bases com pH > 11 (VERONESI e FOCACCIA, 1997).

É pouco resistente fora do ambiente, sendo inativado pelo formol a 2% e NaOH 3%. Resiste dois minutos quando em temperatura de 80°C, cinco minutos a 60°C, quatro horas a 40°C e vários dias a 4°C. A dessecação lenta mata-o, embora preservando sua capacidade imunogênica, o mesmo acontecendo com o tratamento por doses adequadas de fenol, raios ultravioleta ou beta-propiolactona. Tira-se proveito deste fato para o preparo de vacinas inativadas (VERONESI e FOCACCIA, 1997).

O vírus conserva-se muito bem em glicerina a 50%, na geladeira a 4°C, no freezer a -70°C e em estado liofilizado. Os cadáveres de animais em putrefação e autólise podem conservar material virulento durante semanas. Na saliva ressecada o vírus perde sua virulência em poucas horas, à temperatura ambiente. Álcool 70% pode ser utilizado para desinfetar as mãos e no caso de mordida lavar com sabão ou então com soluções ácidas como suco de limão (VERONESI e FOCACCIA, 1997).

A forma ideal de conservar a atividade do vírus consiste nas preparações que contém 2% de proteína do soro normal ou 0,75% da fração V de albumina bovina, preparações essas que devem ser liofilizadas e mantidas a -70°C (VERONESI e FOCACCIA, 1997).

2.3.4 Cultura de Vírus em Células

O vírus da Raiva se multiplica em vários tipos de culturas celulares, particularmente em células de embrião de galinha, células renais de Hamster e células de linhagem contínua com BHK-21, clone 13 (Baby Hamster Kidney), ou células diplóides humanas (WI-38). As células infectadas não exibem efeito citopático, porém o vírus pode ser evidenciado à microscopia eletrônica sob a forma de partículas dispersas no citoplasma ou formando aglomerados (MORENO, 2002).

O cultivo celular é mais indicado para produção de imunobiológicos e diagnóstico laboratorial, onde a linhagem celular preconizada é a de neuroblastoma murino (NA-C1300), cuja replicação dos vírus é revelada pela IFD. O resultado do teste é obtido em 18 horas pós-inoculação; geralmente a incubação é continuada por 48 horas e, em alguns laboratórios, por até quatro dias. Esse teste é tão sensível quanto o teste de inoculação em camundongos. Uma vez existindo a unidade de cultura celular no laboratório, esse teste deve substituir o teste de inoculação em camundongos, evitando, assim, o uso de animais vivos; é menos oneroso e apresenta resultado mais rápido (MARA, 2005).

Resultados duvidosos de diagnóstico positivo para Raiva, feitos pela técnica de imunofluorescência, foram reavaliados em um teste de produção viral sobre células de neuroblastoma murino, no qual, das 37 amostras suspeitas, 17 tiveram positividade confirmadas para Raiva (HOSTNIK et al., 2001).

2.4 Fisiopatologia da Raiva

A patogenia da Raiva ainda não está totalmente esclarecida. Embora haja muitas similaridades na patogênese em vários hospedeiros e sobre diferentes condições experimentais, onde certos aspectos podem ser modificados de acordo com a espécie animal, idade, linhagem viral, dose, taxa de inoculação e a resposta imune (TORDO et al., 1998).

No mundo, a Raiva é uma das doenças infecto-contagiosa que possui o maior número de animais como reservatórios (ROLIM et al., 2006), cujas espécies, foram classificadas de acordo com sua susceptibilidade: espécies de alto risco (cães, gatos e animais silvestres), médio risco (bovinos, caprinos, ovinos, suínos e eqüinos) e de baixo risco (coelhos e roedores), não existindo na literatura registro de transmissão a humanos por este último grupo (VERONESI e FOCACCIA, 1997).

O cão e o gato são os animais relatados com maior freqüência como fonte de infecção e como transmissores da doença aos seres humanos, enquanto que para os herbívoros são os morcegos, as raposas, os guaxinins e os cães; mas o quadro é muito diferente na maioria dos países do mundo. Tais diferenças existem devido ao grande número de espécies de animais capazes de atuarem como reservatórios da doença e das diversas formas que elas interagem em seus habitats (GOMES, 2004 *apud* KAPLAN, 1985).

A Raiva humana transmitida por cães é favorecida pela estreita relação afetiva dos humanos com estes animais, principalmente com crianças. Além disso, baixas condições de vida e de trabalho, somada ao longo período do tratamento profilático e seu difícil acesso por não está descentralizada na maioria das cidades, falta de recursos dos acidentados para se transportarem para atendimento, receio

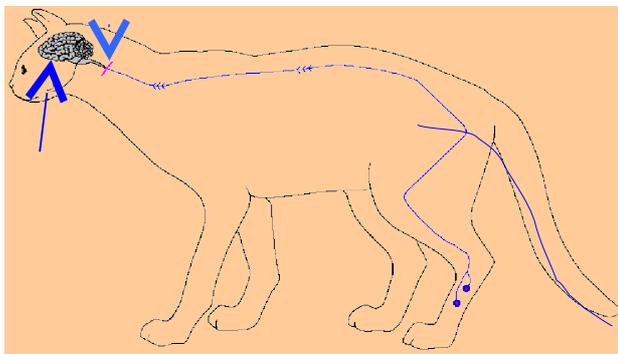
de descontos salariais ou de faltar/perder o emprego, e o grande número de pessoas agredidas por cães nas áreas urbanas, são fatores básicos responsáveis pela transmissão da Raiva canina aos seres humanos (ROLIM et al., 2006).

Sua principal forma de transmissão ocorre pela mordedura com conseqüente inoculação dos vírus da Raiva, presente na saliva dos animais infectados, nos susceptíveis, podendo ocorrer também, através de arranhaduras, lambeduras, aerossóis, contato com secreções e transplante de órgãos. O período de incubação é determinado pela penetração dos vírus até a apresentação dos primeiros sinais clínicos da doença, que podem variar de dias a anos, sendo mais comum entre 30 e 90 dias após a infecção (FUNASA, 2002).

Os vírus da Raiva são considerados “neurotrópicos”, mas infectam vários outros órgãos que não fazem parte do SNC, tais como, língua, glândulas salivares, pulmão, fígado, glândulas adrenais, coração, trato gastrointestinal, rins, e pâncreas, confirmando seu caráter centrífugo. A via sanguínea não tem importância na distribuição dos vírus pelo corpo (GERMANO et al, 1998b; JOGAI et al., 2002).

Os vírus da Raiva ao serem inoculados por via subcutânea ou intramuscular, como ocorre naturalmente nas mordeduras, podem alcançar diretamente, as terminações nervosas sensoriais e/ou motoras, ou permanecer por tempo indeterminado nas células musculares estriadas do tecido atingido, onde ocorrerá o processo de amplificação viral, que propiciará a infecção dos nervos periféricos (TSIANG, 1988).

Acredita-se que a infecção das células nervosas é mediada por uma região da glicoproteína do virion (trimeres ou epítomos) que se liga à membrana plasmática das células hospedeiras, nas quais, os sítios de ligação são os receptores da acetilcolina (TORDO et al., 1998). Glicosídeos e resíduos do ácido siálico estão relacionados com a fixação do vírus à membrana celular, assim como, gangliosídeos sializados e outros lipídeos participam desta adesão (TSIANG, 1988).



Inoculação dos virus

FIGURA 10: TRAJETO DOS VÍRUS DA RAIVA A PARTIR DO PONTO DE INOCULAÇÃO

Fonte: Bingham, 2002

O genoma viral é transportado no interior do axoplasma dos neurônios, centripetamente, à razão de 50 a 100 mm por dia, até alcançar o Sistema Nervoso Central (TSIANG et al., 1991). A virulência dos vírus da Raiva depende mais de sua integridade, do que do nível de disseminação ou de distribuição topográfica da infecção. Porém, os sinais clínicos, tais como ataxia ou depressão, são conseqüências do efeito direto dos vírus na função das células neurais (TOLLIS et al., 1991).

A infecção do sistema límbico, responsável pelo comportamento e, conseqüentemente, pela agressividade manifestada pelos hospedeiros durante a doença, bem como a infecção das glândulas salivares, através da qual há a eliminação de grande quantidade de vírus, são fatores fundamentais para a transmissão da Raiva. Estudos realizados com miotubos comprovam a replicação viral a esse nível e revelam que a junção neuro-muscular representa um local para deslocamento dos vírus para os nervos periféricos (TSIANG et al., 1991).

Estudos mais detalhados sobre a patogenia da Raiva tornam-se de fundamental importância para elucidar qual a forma que os vírus da Raiva adquirem durante o período de incubação, o papel específico do tecido muscular e da junção neuro-muscular, assim como, dos nervos periféricos na progressão dos vírus no organismo dos hospedeiros (BAER, 1998). Esses aspectos assumem relevância, quando observados casos de Raiva humana com períodos de incubação longos, tais como, os verificados nos EUA com imigrantes provenientes do México (11 meses), do Laos (4 anos) e das Filipinas (6 anos), e, na Austrália, com imigrante procedente do Vietnã (6 anos e 4 meses) (BENMANSOUR et al., 1991).

2.4.1 Período de incubação

O período de incubação da Raiva em animais e seres humanos é muito variável, e depende de fatores que se encontram relacionados com a cepa viral, quantidade de vírus inoculado, local de inoculação, tipo de lesão e fatores relacionados ao sistema imune do animal agredido.

No ser humano, o período médio de incubação é de 20-60 dias, embora hajam relatos de períodos excepcionalmente longos. Por sua vez, a determinação do período de incubação da Raiva de forma natural nos animais é de difícil comprovação, pela dificuldade em registrar o momento exato da inoculação dos vírus. Entretanto, estudos experimentais realizados em diferentes animais, utilizando amostras de vírus da Raiva de diferentes origens, demonstraram variações com períodos extremamente longos ou demasiadamente curtos.

Em cães, o período médio é de 3-8 semanas, com extremos de 10 dias a 6 meses. Em “skunks” gambás (*Mephitis mephitis*), de 105 -177 dias. Em bovinos expostos a morcegos *Desmodus rotundus* infectados, de 20 -165 dias; em bovinos mantidos em condições de campo, 60 – 75 dias; em bovinos inoculados por via intramuscular, 25 – 611 dias. Ovinos e caprinos inoculados por via intramuscular com amostras obtidas de raposa *Dusicyon vetulus*, do Nordeste brasileiro, 17 – 18 dias. Em asininos inoculados por via intramuscular com a mesma amostra, 92 – 99 dias, e em eqüinos, 179 – 190 dias.

A variabilidade do período de incubação depende de fatores como: capacidade invasiva, patogenicidade, carga viral do inóculo inicial, ponto de inoculação, idade e imunocompetência do animal, entre outros (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2005).

2.4.2 Alterações Patológicas

A Raiva é uma encefalite com degeneração neuronal do cérebro e da medula espinhal. O exame macroscópico do cérebro pode mostrar edema e

hiperemia difusa. Ao exame microscópico, as alterações inflamatórias predominam no tronco cerebral, medula espinhal e gânglios sensitivos, notando-se, infiltrado linfocitário perivascular, nódulos gliais, e necrose de neurônios (VERONESI e FOCACCIA, 1997).

Os corpúsculos de inclusão citoplasmática, denominados de Corpúsculos de Negri, se encontram dentro dos neurônios afetados constituindo uma característica patognomônica da Raiva (Figura 11). Essa inclusão é um corpúsculo esférico ou oval, bem definido, eosinófilo, limitado por um halo claro, negativo pela reação de *Feulgen*, medindo de 2 a 10 micrômetros de diâmetro, com uma massa central de grânulos basófilos constituídos por ribonucleoproteínas virais e componentes celulares (VERONESI e FOCACCIA, 1997).

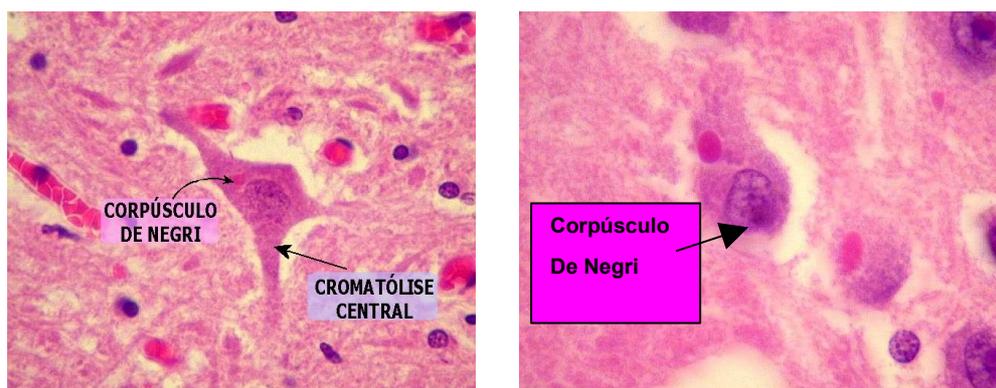


FIGURA 11: CORPÚSCULOS DE NEGRI.

Fonte: Palácio (2003).

Através da imunofluorescência e microscopia eletrônica os corpúsculos de Negri demonstraram ser constituídos de vírus rábicos completos, margeando um centro de proteínas virais. Normalmente são encontrados um ou vários em uma mesma célula, sendo mais comuns nas células do *Corno de Amon* do hipocampo, podendo também ser localizados em outros locais do cérebro e no corno posterior da medula espinhal, bem como no cerebelo (em células de *Purkinje*), (VERONESI e FOCACCIA, 1997).

Freqüentemente estes corpúsculos estão distribuídos tanto no corpo neural como nos dendritos, devido á neurólise, podem ser encontrados livres no tecido de sustentação. Do mesmo modo em neurônios relativamente bem conservados, como também na ausência de alterações inflamatórias. Curiosamente, nas regiões onde os corpúsculos são mais encontrados (hipocampo e cerebelo) as alterações inflamatórias são discretas ou ausentes. Por isto, é importante que o exame histopatológico do cérebro, inclua, além destes, fragmentos de tronco cerebral ou de medula espinhal para pesquisa de infiltrado inflamatório. Estes Corpúsculos não são encontrados em todos os casos, mas são maiores e mais numerosos em pacientes com sobrevida maior (mais que 5 dias) e raros ou ausentes com menos de 48 horas, sendo importante salientar que em cerca de 20% dos casos não é possível encontra-los (VERONESI e FOCACCIA, 1997).

2.4.3. Resposta Imune

A resposta imune é o resultado da expressão, ou não, de doenças que ocorrem naturalmente. Estudos experimentais sugerem que a resposta imune pode influenciar a susceptibilidade, período de incubação e morbidade, os tipos de sinais clínicos e a excreção dos vírus. Estes fatos freqüentemente dependem da interação da resposta imune com outras variáveis, como, idade, espécie animal, linhagem viral, taxa de inoculação e dose viral (WANDELER, 1994).

Os “vírus de rua” da Raiva induzem a produção de interferon, de fixadores de complemento e anticorpos neutralizantes; estes últimos constituem um componente crítico da resposta imune, por serem produzidos em resposta à glicoproteína do vírus da Raiva, ou seja, sua produção são células T-dependentes, que requerem células T CD4+ e células B. São também considerados mais efetivos nos estágios iniciais da infecção, antes da entrada dos vírus no interior dos nervos periféricos, no momento que a infecção atinja o SNC, os anticorpos tornam-se relativamente ineficientes (TORDO et al., 1998).

A relação infecção viral seguida de imunidade foi notada há mais de 200 anos. Seguindo esta evidência, KNIPE (2001), descreveu os mecanismos imunológicos relacionados aos processos de infecção viral, mostrando a importância da compreensão da resposta imune antiviral, para avaliar problemas clínicos e descobrir os mecanismos do sucesso das vacinas antivirais, tanto vírus vivo modificado quanto inativados induzem altos títulos de anticorpos neutralizantes, o que ocorre normalmente entre 7 e 21 dias após a vacinação (período negativo de imunidade).

As Infecções virais agudas são mediadas pela replicação viral e a imunidade dos seres vivos infectados, tendo como resultado a morte ou a conclusão da infecção seguida de recuperação. Muitos dos sintomas clínicos sistêmicos manifestados durante a infecção viral são conseqüências da reação imune do ser vivo infectado, e não da replicação viral em si, pois as citocinas liberadas em resposta a infecção podem também levar a sintomas sistêmicos (KNIPE et al., 2001).

Respostas imunes podem ser denominadas antígeno-específicas (adaptativas) ou antígeno inespecíficas (inatas). As respostas adaptativas são mediadas por linfócitos que reconhecem desenhos antigênicos específicos, e têm memória, enquanto que as inatas, como interferon, células "natural killer", respostas mucociliares, são incapazes dessas atividades. Quando ocorre a primeira exposição aos vírus, tanto as respostas específicas quanto não específicas são ativadas. Em uma segunda exposição ao mesmo agente, a resposta específica ocorre de forma mais rápida e intensa, devido à amplificação de células de memória, enquanto que a resposta não específica ocorre praticamente com a mesma intensidade e forma como aconteceu durante a primeira exposição. Os efeitos benéficos da vacinação estão precisamente nesta indução de células de memória (KNIPE et al., 2001).

As imunidades inata e adaptiva são importantes para debelarem a infecção viral. A imunidade adaptiva depende principalmente de duas classes de linfócitos, os linfócitos T, de origem do timo, e linfócitos B, que originam células plasmáticas produtoras de anticorpos, os quais atuam principalmente na redução da infectividade causada por vírus livres, enquanto que células T reconhecem e muitas vezes lisam células infectadas. Assim, anticorpos e linfócitos T atuam de forma complementar, anticorpos reduzem a infectividade dos vírus livres presentes nos componentes líquidos (plasma, licor cefaloraquidiano, licor intersticial e intercelular), e conseqüentemente a quantidade de células infectadas. Simultaneamente, os linfócitos T lisam estas células infectadas antes que ocorra a maturação viral, diminuindo a liberação de vírus infecciosos, reduzindo assim, o trabalho dos anticorpos e promovendo o controle da infecção (KNIPE et al., 2001).

O ápice da resposta das células T ocorre geralmente entre 7 a 10 dias, após a infecção, onde 50% a 60% das células CD8+ são vírus específicos. Este número vai diminuindo aos poucos, juntamente com a redução da infecção. Aproximadamente um mês após o início da infecção, ainda restam até 10% de células CD8+ esplênicas específicas (de memória). Respostas de anticorpos são detectáveis após a resposta das células T, sendo muitas vezes pouco detectáveis na fase aguda ou sintomática da infecção. Elevam-se durante um período de 2 a 4 semanas, permanecendo por semanas a meses, dependendo da espécie de animal envolvida e dos vírus. Como moléculas de anticorpos têm meia-vida expressa em semanas, a presença de anticorpos implica em produção constante, a qual pode ser estimulada por uma re-exposição aos vírus semelhantes presentes na população de animais infectados (KNIPE et al., 2001).

A produção de anticorpos por longos períodos pode ser efetivada por células plasmáticas de sobrevivência longa. Quando da re-exposição a um mesmo

antígeno, ambas as classes de linfócitos apresentam memória antígeno-específica. É possível verificar a resposta por anticorpos ou anamnésica, com títulos de anticorpos elevando-se rapidamente e em maior número que antes, mantendo-se geralmente por períodos mais longos (KNIPE et al., 2001).

Respostas secundárias de células T citotóxicas, também são abruptas devido à presença de células T de memória, que proliferam em contato com antígenos. A permanência da memória das células T ainda não está completamente elucidada, podendo se dar pela persistência de antígeno específico ou na sua ausência, talvez estimulado de forma não específica por liberação local de citocinas durante outras reações imunes não relacionadas antigenicamente (KNIPE et al., 2001).

Anticorpos reconhecem antígenos, vírus livres, assim como proteínas virais (geralmente glicoproteínas) expressas na superfície das células infectadas. Daí sua importância no controle das viroses. Por outro lado, células T também são importantes, pois reconhecem praticamente qualquer proteína viral, sendo capazes de detectar e destruir as células infectadas (CHARLTON, 1988)

Os vários mecanismos imunes celulares e humorais antivirais atuam em conjunto, tornando-se capazes de eliminar vírus após uma primeira interação vírus - célula, como também, proteger o organismo infectado de uma re-infecção. Assim, são conhecidos vários processos que conferem imunidade contra vírus (CHARLTON, 1988)

Células T podem ser subdivididas pelas proteínas marcadoras de superfície (CD4/CD8) que expressam. A maior parte das células CD8⁺ é linfócitos T citotóxicas (CTLs), apesar de algumas células CD8⁺ exercerem seus efeitos

antivirais principalmente pela liberação de citocina, a maioria das células CD4⁺ é célula "helper" que secretam citocinas para auxiliar na maturação de células B. Tanto células T CD8⁺ quanto anticorpos mais complemento podem lisar células infectadas por vírus. Separadamente as células T CD4⁺ e T CD8⁺ são capazes de eliminar vírus.

A importância relativa de cada um destes aspectos da resposta imune varia na evolução das infecções virais específicas. Há evidências que células T CD8⁺ e T CD4⁺ sejam importantes na resolução de infecções virais, sendo os anticorpos o maior mediador para resistência à reinfeção (KNIPE et al., 2001).

Neurônios não expressam a classe I de MHC (major histocompatibility complex), tornando-os incapazes de apresentar antígenos a células T. Como MHC difere entre os diferentes indivíduos, cada qual apresenta partes diferentes (epitopos) de um determinado antígeno (ou vírus), portanto, monta a resposta de células T de especificidades de epitopos diferentes. As duas classes de MHC refletem caminhos de processamento de antígeno diferentes, uma das quais (classe I) é otimizada para apresentar antígeno intracelular, e a outra (classe II) para apresentar antígeno extracelular. Isto significa que quando células T distinguem entre um complexo peptídeo classe I e um complexo peptídeo classe II, em verdade eles estão discriminando baseado na origem do peptídeo: de proteína produzida dentro da célula, ou de proteína captada do ambiente extracelular (KNIPE et al., 2001).

2.5 Abordagem Clínica

2.5.1 Fatores Determinantes das Manifestações Clínicas

Espécie animal, susceptibilidade, período de incubação, morbidade, sinais clínicos e excreção viral, são pontos-chaves ao considerar as manifestações clínicas

posteriores, estendendo-se por todo o corpo do animal, dificuldade de deglutição, sialorréia, coma e morte. O animal geralmente vem a óbito entre 5 a 7 dias após o aparecimento dos sinais (PERL e GOOD, 1991; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FUNASA, 1998).

2.5.3 Manifestações Clínicas em Animais Silvestres

A sintomatologia clínica em animais silvestres (raposas, gambás, guaxinins, sagüis) infectados de modo experimental é similar à dos cães; a maioria apresentando Raiva do tipo furiosa, e com menor freqüência a Raiva parálítica. A duração da enfermidade é variável, assim como o período de incubação, o qual raramente é menor que 10 dias ou maior que 6 meses. Há poucos estudos sobre o período de transmissão, sabendo-se que varia de espécie para espécie. Quando acomete os carnívoros, a Raiva se apresenta com maior freqüência na forma furiosa (ACHA E SZYFRES, 1986).

O comportamento da Raiva em morcegos também é pouco conhecido. Há relato de eliminação de vírus da Raiva na saliva, por um período de até 202 dias, no morcego *D. rotundus*, sem sinais aparentes da doença, comprovando seu poder de albergar o vírus rábico em sua saliva e ser infectante antes de adoecer, por períodos maiores que das outras espécies. Alguns aspectos da doença em morcegos foram observados, como: Raiva furiosa típica, com paralisia e morte; Raiva furiosa e morte sem paralisia; e Raiva parálítica típica e morte (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2005).

Com relação aos herbívoros não se sabe exatamente o período durante o qual podem transmitir a doença. Mesmo não possuindo uma dentição adequada que permita causar ferimentos profundos, há relatos de Raiva transmitida aos seres humanos por herbívoros. Assim, é recomendado que não se introduza as mãos na

boca de qualquer espécie animal com sinais nervosos sem o uso de luvas apropriadas (MAPA, 2005).

Deve-se considerar que os sinais e sintomas das diferentes apresentações não seguem necessariamente seqüências obrigatórias ou apresentam-se em sua totalidade. Em consequência das características da doença, o animal raivoso é facilmente atropelado em vias públicas e estradas, o que exige muito cuidado ao socorrer estes animais. Existem relatos de animais e humanos que se recuperaram de Raiva, mas o número é insignificante (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2005).

2.6 Diagnóstico

A Raiva é uma doença de notificação compulsória, cuja confirmação é feita através do diagnóstico laboratorial. Na maioria dos países do mundo, a Raiva em animais e seres humanos continua sendo diagnosticada com base em sinais e sintomas clínicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2004 *apud* MORENO, 2007).

O diagnóstico da Raiva pode ser feito clinicamente através da sintomatologia e do tempo de evolução até a morte do animal, sendo necessários, testes laboratoriais para a confirmação da doença (KING e TURNER, 1997).

O diagnóstico clínico nos animais torna-se às vezes difícil, existindo casos em que cães raivosos são considerados não-infectados, podendo também, antes dos primeiros sinais e sintomas, apresentar vírus nas glândulas salivares e serem liberados junto com a saliva, aumentando a situação de risco para seres humanos. Nestes, o diagnóstico também pode ser confundido com outras doenças que apresentam sinais paralíticos (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD - OMS, 1992).

Para realizar o diagnóstico laboratorial da Raiva, o material escolhido é o SNC, principalmente as porções do cérebro, cerebelo, e os cornos de Amon (Figura 12) (HEUSCHELE, 1987; FISHBEIN e ROBINSON, 1993; GERMANO et al., 1998b).

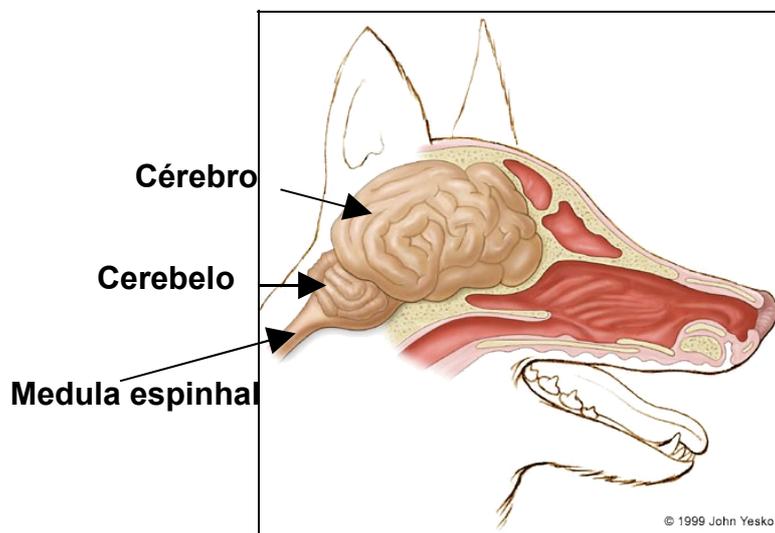


FIGURA 12: SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Fonte: Yesko, 1999.

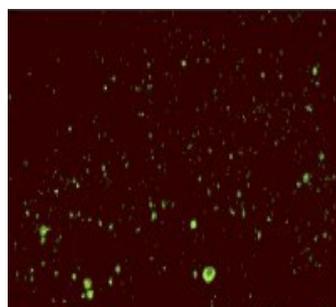
Alguns estudos conduzidos para detectar quais as regiões do cérebro os antígenos da Raiva são encontrados com maior frequência, revelaram o tálamo como a estrutura de escolha para o diagnóstico, com 97,8% de frequência de antígenos da Raiva (BINGHAM et al., 2002), enquanto outros estudos revelaram que qualquer porção do SNC, principalmente o cérebro, poderia ser utilizada na realização das provas laboratoriais da Raiva, uma vez que os vírus ao atingirem os nervos periféricos alcançariam a medula espinhal, cerebelo e chegariam ao cérebro para replicação (LEE e BECKER, 1972; SILVA et al., 1974; ITO et al., 1985; SMITH, 1996; CARRIERI, 2006).

Germano et al. (1998b), analisando a disseminação viral por diferentes órgãos, verificaram positividade por Imunofluorescência Direta (IFD) utilizando-se medula espinhal e cérebro de animais infectados, enquanto Silva et al. (1973) observaram presença de antígenos virais na saliva e sua ausência no encéfalo.

Nos últimos anos, várias técnicas têm sido utilizadas para realização dos exames laboratoriais da Raiva, a saber: Prova de Sellere - detecção da presença dos corpúsculos de Negri (Figura 13-A); Prova de Imunofluorescência - detecção de antígenos (Figura 13-B); Prova biológica (Figura 13-C); Isolamento do vírus *in vitro* - cultivos celulares; Identificação dos vírus empregando anticorpos monoclonais; Detecção através de técnicas moleculares, Transcriptase reversa – Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR); Titulação de anticorpos - prova rápida de inibição focal de fluorescência (RFFIT) (DAVID et al., 2002).



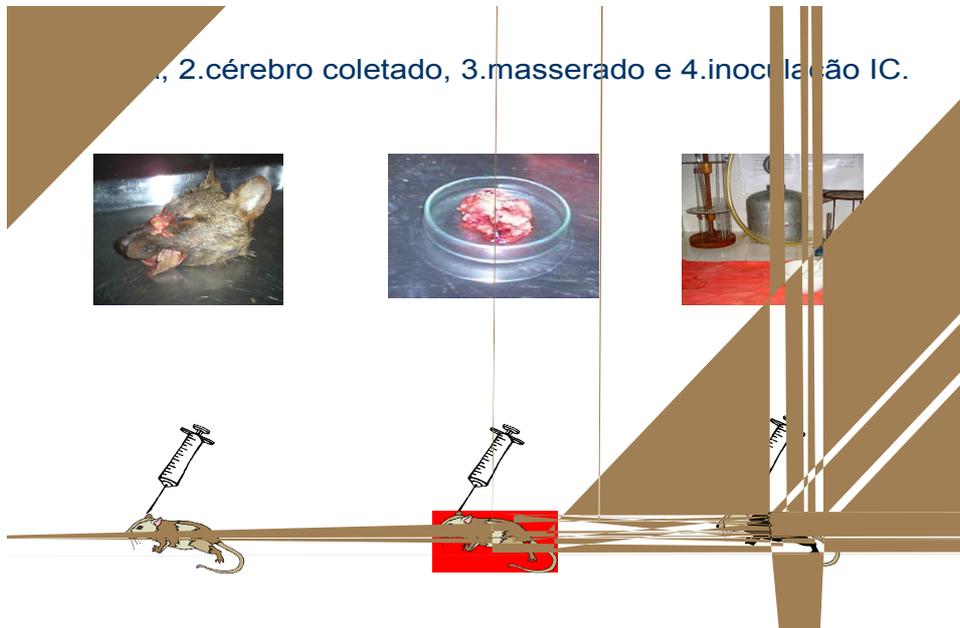
FIGURA 13-A: SELLERE

FIGURA 13-B:
IMUNOFLUORESCÊNCIAFIGURA 13-C: INOCULAÇÃO
INTRACEREBRAL

De acordo com a Organização Panamericana de Saúde (1983 e 2005), e até o presente momento adotado no Brasil, as técnicas de imunofluorescência direta (IFD) (Figura 14, A, B, C) e Inoculação intracerebral (IC) (Figura 15) são utilizadas como provas de rotina par o diagnóstico laboratorial para Raiva.

A. Amostra de SNC	B. Impressão em lâmina	C. Análise de IFD

FIGURA 14: PROVA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD).



ainda que, a vacinação profilática não está totalmente livre de riscos, por isso, não deve ser utilizada quando podemos observar o animal e este não apresenta sinais de Raiva, e mesmo assim, é muito utilizada (NOAH et al.;1996).



Vacinação de Cães



Captura de Cães



Profilaxia da Raiva Humana



Educação para o Controle da Raiva.

FIGURA 16: PRINCIPAIS MEDIDAS PARA UM PROGRAMA DE CONTROLE DA RAIVA

Fonte: Programa de controle da Raiva – Ceará.

Percebendo a importância do exame laboratorial de Raiva na redução do número de pessoas tratadas, nas medida de controle e prevenção, no ano de 2000, o Ministério da Saúde (MS), através das Secretarias Estaduais de Saúde, compactuou com as secretarias municipais de saúde, para que estas enviassem 0,2% de amostras da população de cães e gatos do município, para exame laboratorial da Raiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE - NORMA TÉCNICA DA RAIVA, 2002).

Como resultado desta pactuação, o laboratório para diagnóstico da Raiva no Estado do Ceará, que recebeu no período de 1995 a 1999 uma média anual de 346 amostras (cães e gatos inteiros ou a cabeça), passou a receber já no ano de 2000, 715 animais inteiros ou suas cabeças. Em 2005, recebeu 1.425 animais inteiros ou suas cabeças, representando um aumento respectivo de 206%, e 412% no número de amostras recebidas. Destas, 1.379 (97%) foram de cães, gatos e animais silvestres (RELATÓRIO ANUAL DA COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE CONTROLE DA RAIVA-CE, 2006).

Contudo, esse laboratório não estava preparado para esta demanda, assim, ocasionou perda de amostras, aumento dos tratamentos profiláticos, demora no diagnóstico, e dificuldades para descarte das carcaças.

3 JUSTIFICATIVA

De acordo com O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta, EUA (1995), o SNC (cérebro) é o local de escolha para a coleta de material para exame de Raiva em animais após o óbito. Essa coleta deve ocorrer de forma rápida, e quando isso não for possível, o material deve ser acondicionado no gelo e em seguida transportado ao laboratório para exame.

Por não existir uma padronização para coleta e envio de SNC ao laboratório, os animais suspeitos de Raiva chegam inteiros ou com a cabeça dentro de recipiente em condições inadequadas, infectando susceptíveis por ocasião da coleta e no trajeto até chegar ao laboratório.

No Estado do Ceará, a recepção de material para exame da Raiva funciona 24 horas, inclusive nos fins de semana e feriados. Porém, nos dias úteis após feriados prolongados, o freezer disponibilizado para acondicionar estes materiais (animais inteiros ou cabeças) fica cheio, com a tampa entreaberta, por conseguinte, conservando impropriamente, propiciando a perda destes materiais, com graves conseqüências para os acidentados.

Por a medula cervical fazer parte do sistema nervoso central (SNC), e ser passagem obrigatória dos vírus rábicos para o cérebro, onde se multiplicam com intensidade e novamente por ela se disseminam para todo corpo, justifica-se testar sua eficácia como material para o diagnóstico laboratorial da Raiva. Além disso, sua anatomia e localização nos mamíferos facilitam a coleta, acondicionamento, transporte e estocagem, assim, viabiliza o diagnóstico, reduzindo os riscos de infecção por manipulação de materiais inadequados, restringindo os tratamentos profiláticos humanos, e diminuindo os abandonos de vacinações profiláticas,

contribuindo de forma significativa com a vigilância epidemiológica e o controle da doença.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Testar a eficácia da medula cervical, como material para o diagnóstico laboratorial da Raiva.

4.2 Específicos

- Realizar diagnóstico laboratorial da Raiva, através das provas de imunofluorescência direta (IFD), e inoculação intracerebral (IC), de amostras do cérebro e medula cervical de *Rattus norvegicus* (wistar), experimentalmente infectados por via intramuscular com vírus rábico.
- Realizar diagnóstico laboratorial da Raiva, através da prova de imunofluorescência direta (IFD), das amostras do cérebro e da medula cervical de *Rattus norvegicus* (wistar), experimentalmente infectados por via intracerebral com vírus rábico.
- Comparar a porcentagem de positividade entre as amostras oriundas do cérebro e da medula cervical, dos *Rattus norvegicus* (wistar) experimentalmente desafiados por via intracerebral com vírus da Raiva (Prova biológica).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Local do Experimento

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Virologia do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária – PPGCV, da Universidade Estadual do Ceará – UECE. No Laboratório do Núcleo de Endemias - NUEND, da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará - SESA. No Laboratório de Diagnóstico da Raiva, do Centro de Controle de Zoonoses do Crato - CCZC.

5.2 Obtenção dos Vírus Utilizados no Experimento

Para a realização deste experimento, os vírus da Raiva foram obtidos originalmente, de uma amostra de sistema nervoso central (cérebro), isolada de um cão comprovadamente raivoso, e gentilmente cedida pelo Laboratório de Diagnóstico da Raiva do Centro de Controle de Zoonoses do Crato - CE.

Com a finalidade de trabalhar com amostras intactas, de fácil identificação anatômica e mais confiável, replicou-se os vírus desta amostra canina. Para tanto, com auxílio de um graal de tamanho pequeno, macerou-se 5g dessa amostra em 95mL de solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) e filtrou-se em gaze. Deste filtrado inoculou-se 0,3mL por via IC em três *Rattus norvegicus* (wistar), cedidos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências VetF



FIGURA 17: COLETA DO CÉREBRO DE *RATTUS NORVEGICUS* (WISTAR).

Fonte: Rolim, 2006, Foto do experimento.

5.3 Animais do Experimento

Para realização deste experimento utilizaram-se sessenta e cinco (65) *Rattus norvegicus* (wistar), provenientes do Biotério Central – BIOCEM, da Universidade Federal do Ceará – UFC. De ambos os sexos, com 30 dias de idade, peso vivo (p.v) mínimo de 85g e máximo de 100g. Estes ratos foram separados de forma aleatória em dois grupos (controle e experimental) e estes, em 11 onze subgrupos, contendo cada um 5 animais, os quais permaneceram confinados em 13 caixas apropriadas para *R. norvegicus* durante todo experimento. (Quadro 1).

5.4 Manejo dos Animais

Os *Rattus norvegicus* (wistar) destinados ao experimento, foram confinados em caixas brancas de polietileno possuindo as seguintes dimensões, 40cm x 25cm x 20cm, com tampa de ferro galvanizado, contendo comedouro e dispositivo para acoplar a chupeta para água. Na instalação do experimento, as caixas foram lavadas com água e sabão, flambadas com vassoura de fogo, e forradas com cama de maravalha esterilizada, propiciando conforto, bem estar e saúde aos animais, os quais, durante o experimento foram alimentados com água tratada e ração comercial para roedores, á vontade. Para melhor acomodação das

caixas e facilidade no manejo, permaneceram dispostas nas prateleiras das estantes de aço até o final do experimento.

5.5 Desenho Experimental

O experimento foi conduzido em três etapas:

1ª ETAPA: Inicialmente utilizou-se dois grupos, cada um, com cinco animais.

Grupo I, destinado como grupo controle, os cinco *Rattus norvegicus* foram inoculados por via intramuscular (IM), com 0,5mL de solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl 0,9%), correspondendo a mesma dose e solução utilizada como diluente no experimento.

Grupo II, destinado como grupo experimental foi infectado com vírus da Raiva. Para tanto, o cérebro do primeiro dos três *R. norvegicus* que evoluiu para óbito, (por ter sido infectado (IC) com vírus da Raiva de origem canina) foi macerado em 95mL de solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl 0,9%), e filtrado em gaze, dando origem a uma suspensão contendo vírus da Raiva de primeira passagem, com a qual inoculou-se 0,5mL IM, na face interna da coxa de cada um dos cinco *R. norvegicus* do grupo (RI, RII, RIII, RIV e RV), sendo estes mantidos em observação por um período de 28 dias.

Após o óbito, coletou-se de forma separada, incluindo os utensílios de coleta, o cérebro e a medula cervical de cada roedor para realização do diagnóstico laboratorial da Raiva.

2ª ETAPA DO EXPERIMENTO

De cada *R. norvegicus* positivo para Raiva no II grupo desafio (RI, RII, RIII, RIV e RV), foi coletado o cérebro e a medula cervical, utilizando instrumentos separados para cada coleta, cujas amostras foram acondicionadas em recipientes individuais. De forma distinta, cada amostra de cérebro e de medula cervical foi

macerada em 10mL de solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl 0,9%), utilizando recipientes diferentes, e em seguida filtrado em gaze, resultando em cinco filtrados de cérebro e cinco de medula espinhal. De cada um dos cinco filtrados do cérebro, inoculou-se 0,3mL por via intracerebral (IC), em cinco *R. norvegicus*, constituindo cinco subgrupos (RIC; RIIC; RIIC; RIVC; RVC) cada um com cinco repetições, totalizando 25 roedores desafiados com vírus da Raiva de origem cerebral.

Com o mesmo procedimento, de cada um dos cinco filtrados da medula, foi inoculado 0,3mL por via intracerebral em cinco *R. norvegicus*, constituindo os cinco subgrupo (RIM, RIIM, RIIM, RIVM, RVM,) com cinco repetições, totalizando também 25 roedores desafiados com vírus da Raiva de origem medular.

O subgrupo controle (I.I) formado também por cinco *R. norvegicus* foi inoculado por via (IC), com 0,3mL de solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl 0,9%), correspondendo a mesma dose e solução utilizada como diluente nos demais subgrupos experimentais. Completando assim os 11 subgrupos.

3ª ETAPA: Acompanhamento da infecção experimental

Realizou-se acompanhamento dos períodos clínicos, e o desenvolvimento da infecção nos *R. norvegicus*, como também, avaliação das características clínicas entre os animais que receberam inóculo cerebral e medular, relacionando-os com o grupo sham.

5.6 Destino das Carcaças dos Animais do Experimento

De acordo com o Ministério da Saúde – Brasil, e a Coordenação do Programa Nacional de Controle da Raiva, o diagnóstico laboratorial pela técnica de imunofluorescência direta (IFD) é utilizado por possuir boa sensibilidade, rápido resultado e baixo custo, mas precisa ser confirmado pela prova biológica para poder

ser registrado (NORMA TÉCNICA DA RAIVA, 2002). Assim, nesse experimento não houve sacrifício de *R. norvegicus*, e sim, prova biológica, a qual é utilizada como rotina nos laboratórios de diagnóstico da Raiva de todo país.

Os *R. norvegicus* dos 10 (dez) subgrupos, correspondendo a cinquenta (50) animais, por terem sido infectados por via intracerebral com vírus da Raiva, invariavelmente foram a óbito, em um período médio de 9 (nove) dias. Após o óbito, o rato era identificado e acondicionado individualmente em saco plástico e armazenado no freezer a menos 0°, até a ocorrência do último óbito ou por um prazo de 30 dias. Na data mais conveniente, realizou-se a coleta do SNC (cérebro e medula cervical) de todos os animais para exame laboratorial da Raiva. As carcaças foram cremadas em recipiente de ferro apropriado, as sobras da cremação foram acondicionadas em saco plástico e no dia de recolhimento juntou-se ao descarte das carcaças dos animais da demanda espontânea que chegam ao laboratório para diagnóstico da Raiva.

6 RESULTADOS

Todos os *Rattus norvegicus* (wistar) do “Grupo II experimental” evoluíram para óbito, apresentando uma média do período de incubação de 15,2 dias, e do período clínico de 4,2 dias (Figura 18), como também, sinais clínicos compatíveis com a Raiva, tais como: isolando-se do grupo, perda do apetite, emagrecimento acentuado, pêlos eriçados, agitação, incoordenação, paralisia, e óbito, ou fúria com agressividade, paralisia e óbito, evidenciando a patogenicidade da suspensão inoculada.

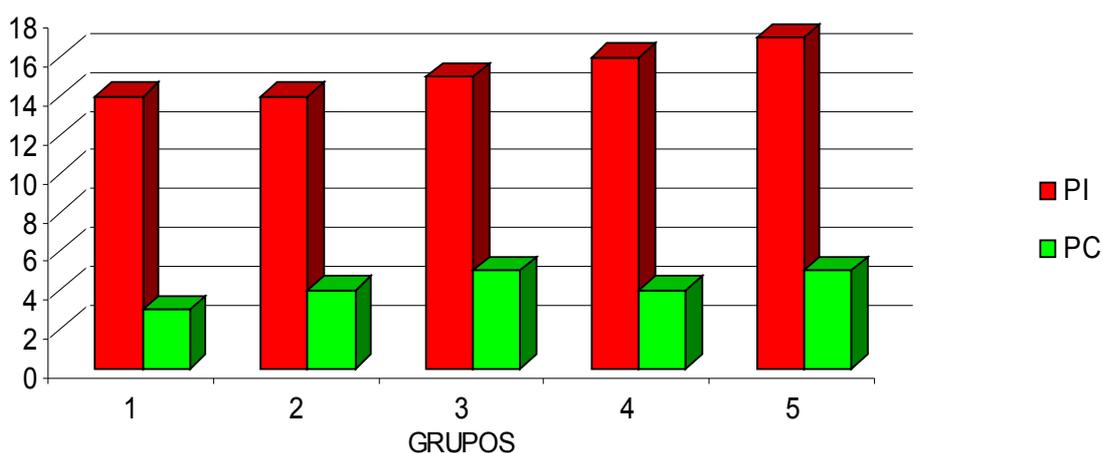


FIGURA18. PERÍODO DE INCUBAÇÃO X PERÍODO CLÍNICO GRUPO EXPERIMENTAL

Por sua anatomia e localização, a medula cervical foi mais fácil de ser coletada, acondicionada e transportada do que o cérebro. Os resultados laboratoriais das amostras examinadas, tanto de cérebro quanto de medula cervical dos *Rattus* do “Grupo II experimental”, foram 100% positivos para Raiva, demonstrando a presença do vírus nas duas regiões estudadas do sistema nervoso central - SNC, e a concordância perfeita das técnicas de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral (IC) (Figura 19).

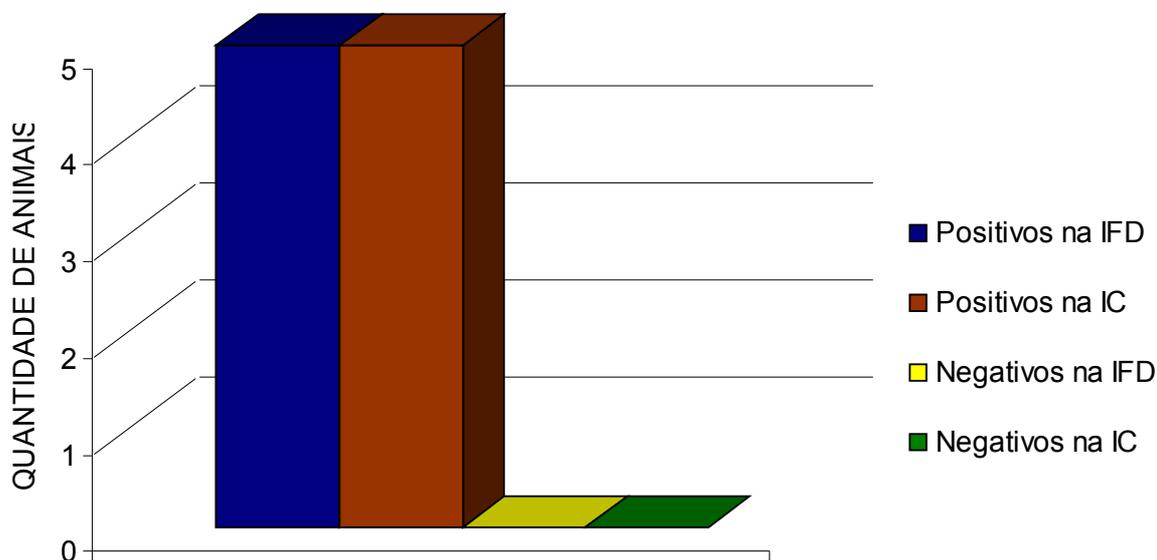


FIGURA 19. RESULTADO NA IFD E IC DO GRUPO EXPERIMENTAL

Os cinco subgrupos constituídos por 25 ratos inoculados (IC) com filtrado de cérebro, assim como, os outros cinco subgrupos formados por 25 ratos inoculados (IC) com filtrado de medula cervical, cujos filtrados foram provenientes dos animais do Grupo II, evoluíram para óbito apresentando sinais clínicos compatíveis com a Raiva.

Os resultados das análises, realizadas em 25 amostras do cérebro, e 25 amostras da medula cervical, obtidas nos dois subgrupos, foram 100% positivas para Raiva, através da prova de imunofluorescência direta (IFD). Estes resultados confirmam a patogenicidade do filtrado de cérebro e de medula cervical dos *Rattus* do Grupo II, como também, comprovam a presença dos vírus da Raiva nas duas regiões pesquisadas do Sistema Nervoso Central (SNC) (Figura 20,21 e 22).

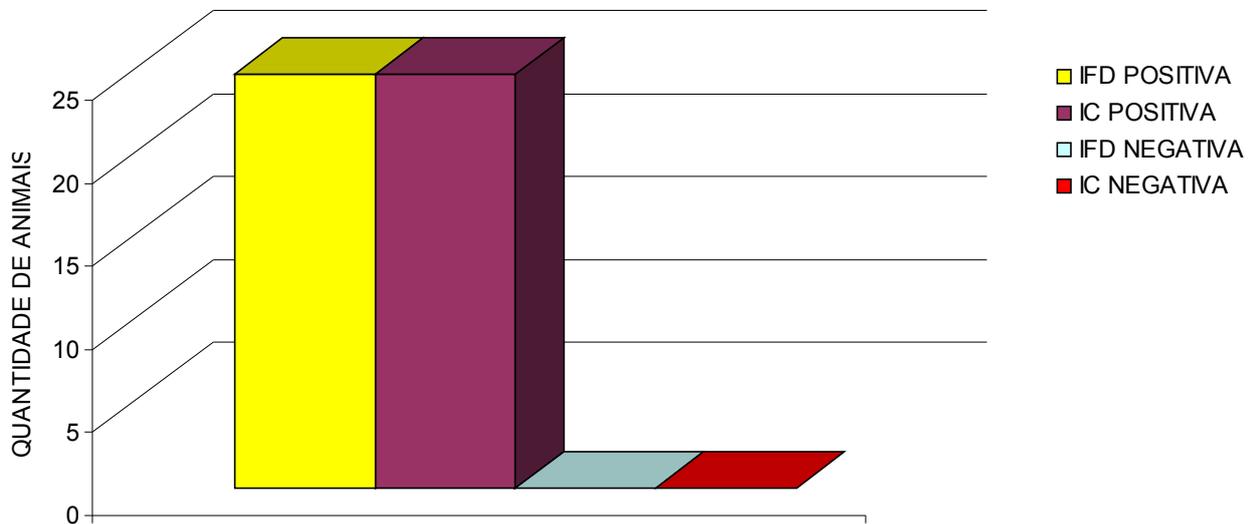
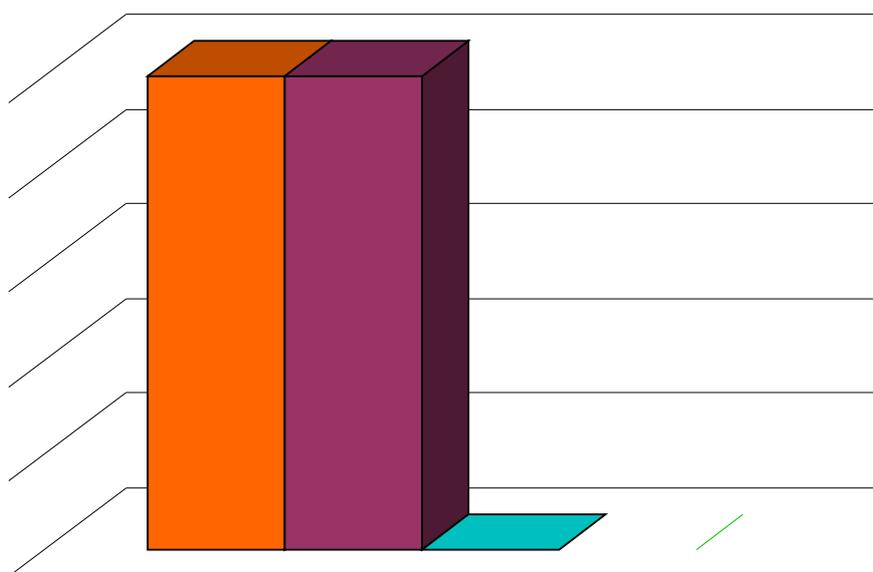


FIGURA 20. RESULTADOS DA IFD E IC DO SUBGRUPO CÉREBRO



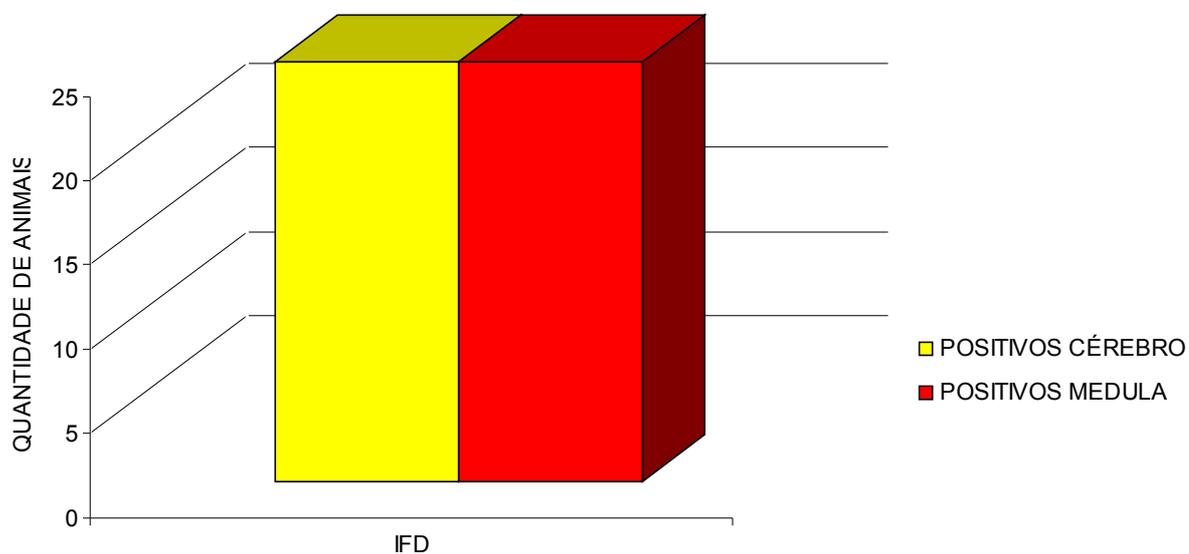


FIGURA 22. COMPARAÇÃO ENTRE AS IFD DO SUBGRUPO MEDULA X CÉREBRO

Os resultados consolidados do período de incubação, assim como, do período clínico, das cinco repetições de cada subgrupo inoculado com 0,3mL IC de filtrado de cérebro ou de medula cervical, se encontram expressos nas figuras 23 e 24.

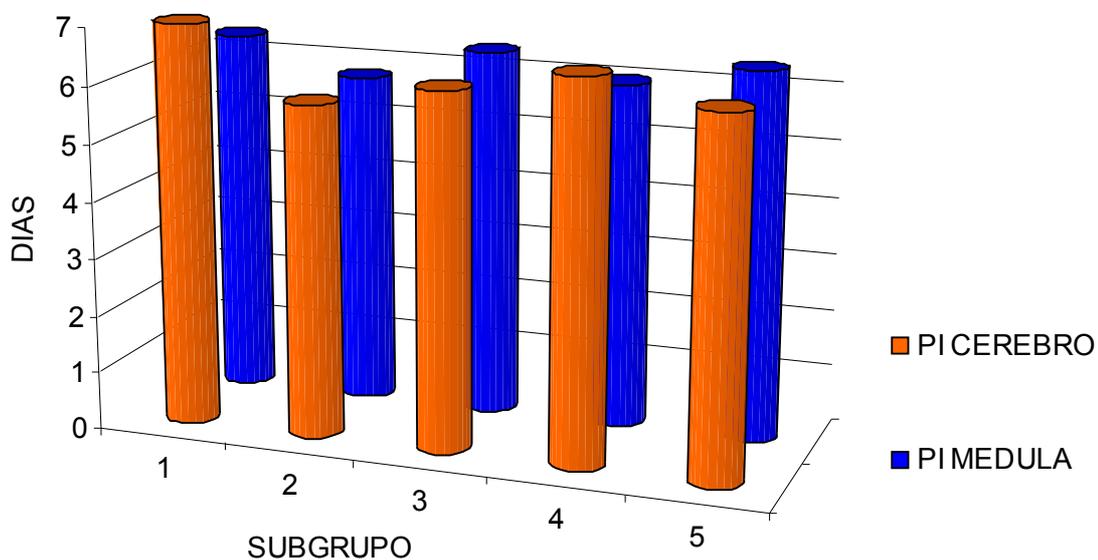


FIGURA 23.COMPARAÇÃO ENTRE OS PI DOS SUBGRUPOS CÉREBRO X MEDULA

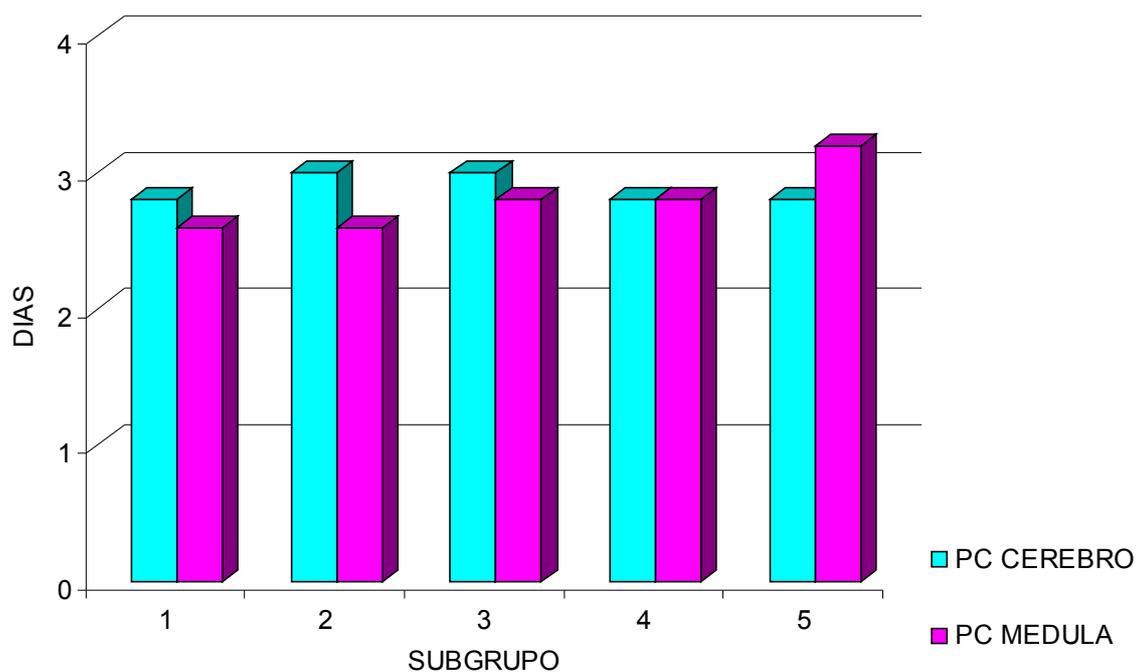


FIGURA 24.COMPARAÇÃO ENTRE OS PC DOS SUBGRUPOS CÉREBRO X MEDULA

Os períodos médios de incubação e clínico, dos subgrupos inoculados com filtrado de cérebro, foram respectivamente de 6,36 e 2,88 dias, ao mesmo tempo, os dos subgrupos inoculados com filtrado de medula foram simultaneamente de 6,2 e 2,8 dias.

7 DISCUSSÃO

Através dos resultados obtidos no presente experimento, pode-se afirmar que, os vírus da Raiva estão presentes na medula cervical dos animais mortos por Raiva. Os resultados da comparação das análises, da medula cervical com as do cérebro, comprovaram uma total concordância entre estas duas regiões do Sistema Nervoso Central (SNC). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Ito e cols (1985), quando detectaram através das técnicas de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral (IC), 100% de antígeno da Raiva no cérebro e na medula espinhal de cães naturalmente infectados, e experimentalmente, por inoculação intramuscular (IM) no masseter, com suspensão de vírus rábico.

Os resultados de positividade (100%) encontrados na medula e no cérebro dos animais neste experimento estão de acordo com os encontrados por Germano et al. (1998b), quando analisaram a disseminação viral por diferentes órgãos (cérebro, medula, língua, coração, pulmão, rim e fígado), em três grupos de camundongos infectados por via intramuscular, com três cepas distintas de vírus rábico, duas caninas (Jales e Nigéria) e uma desmodina (DR19). Onde cada grupo foi constituído por dois subgrupos, um com 21 e outro com 28 dias de idade. Ambos apresentaram 100% de antígenos rábicos no cérebro e na medula de todos os animais, independente das idades e das cepas inoculadas, tal concordância não ocorreu com os demais órgãos pesquisados.

Os resultados obtidos no presente experimento discordam dos encontrados por Silva e cols (1973), quando detectaram cães raivosos com presença de vírus nas glândulas salivares e total ausência no encéfalo. Mas concordam com Morgagni (1769), quando postulou a migração dos vírus da Raiva via nervos, citada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA,

2005, a qual foi confirmada por Heuschele (1987), ao afirmar ser incontroverso o neurotropismo do vírus da Raiva; por Fishbein e Robinson (1993); e por Tsiang, (1988), ao demonstrarem que os vírus da Raiva uma vez atingindo os nervos periféricos, de forma centrípeta alcançam à medula espinhal, por aonde invariavelmente chegam ao cérebro e se replicam com grande intensidade atingindo todo corpo.

A principal forma de transmissão da Raiva ocorre através da mordedura dos animais infectados com conseqüente inoculação dos vírus da Raiva presentes em sua saliva. De acordo com Tsiang (1988), os vírus da Raiva ao serem inoculados como ocorre naturalmente nas mordeduras, podem alcançar diretamente as terminações nervosas sensoriais e/ou motoras, ou permanecer por tempo indeterminado nas células musculares do tecido atingido, onde ocorrerá o processo de amplificação viral, que propiciará a infecção dos nervos periféricos. Resultados semelhantes foram obtidos no presente experimento, simulando infecção natural, através de inoculação IM em *Rattus norvegicus* (wistar) com filtrado de cérebro contendo vírus rábico.

O Programa Nacional de Controle da Raiva determina que quando o diagnóstico laboratorial do animal agressor for negativo pela técnica de imunofluorescência direta (IFD), deve ser suspenso o tratamento profilático e aguardar o resultado da prova biológica (IC). Porém, tal conduta não se aplica para eqüídeos (eqüino, muares e asininos), exceto nos casos em que o material coletado nesses animais e encaminhado para diagnóstico tenha sido a medula, (Norma Técnica da Raiva – FUNASA, 2002). Essa confiabilidade na medula como material para o diagnóstico da Raiva é idêntica à encontrada neste experimento, que independente do local de inoculação (face interna da coxa ou encéfalo) foi 100% positiva para Raiva através das provas de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral (IC).

Os resultados de sensibilidade entre as técnicas de diagnóstico utilizadas neste experimento estão de acordo com as encontradas por Carrieri (2006), quando obteve igual sensibilidade dos testes: imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral (IC), para o cérebro e a medula cervical de 55 eqüinos, o que não ocorreu com as demais regiões do SNC (corno de Amon, córtex e cerebelo) por ela estudadas. Partes desses resultados estão de acordo com Silva et al. (1974), notadamente, pela detecção de vírus da Raiva na medula de eqüinos naturalmente infectados, e em discordância por sua ausência nas diferentes regiões do Sistema Nervoso Central, e outros tecidos, admitindo sua detecção infrutífera quando pesquisado no cérebro e no cerebelo.

Smith (1996) recomendou a medula cervical, córtex e hipocampo, como as regiões de escolha para o diagnóstico laboratorial da Raiva, através das provas de imunofluorescência direta (IFD) e biológica (IC). O cérebro e medula cervical provaram ser as melhores regiões para o diagnóstico laboratorial da Raiva, possuem a mesma sensibilidade, sendo esta, maior do que a encontrada no hipocampo, cortical e regiões cerebelares. Estes resultados concordam com os obtidos neste experimento.

Chopra e cols (1980), Charlton (1988), citados por Carrieri (2006), observaram que a Raiva parálitica em humanos é caracterizada pela destruição de células nervosas, proliferação da micróglia, e infiltração perivascular observadas principalmente no cérebro e na medula cervical, enquanto na Raiva clássica (furiosa) as reações inflamatórias, alterações vasculares e inclusões de corpúsculos são mais difusas no tálamo, hipotálamo, cerebelo e medula cervical. Resultados idênticos foram encontrados por Perl e Good (1991), confirmando as lesões da Raiva parálitica sempre encontrada na medula cervical e no cérebro, em conclusão, os resultados evidenciaram a infalível presença de antígenos rábicos no cérebro e na medula cervical, credenciando estas duas regiões do SNC, como as mais indicadas para o diagnóstico laboratorial da Raiva. Os resultados do presente experimento

concordam com a indicação prioritária destas regiões do SNC como material de escolha para o diagnóstico laboratorial da Raiva.

A presença de antígenos rábicos em 100% das amostras de medula cervical dos animais que foram a óbito no presente experimento está de acordo com os resultados obtidos por Lee e Becker (1972); Ito et al. (1985); Germano et al. (1998a); Bingham e cols (2002).

O diagnóstico laboratorial da Raiva é de fundamental importância, e seus resultados subsidiam a vigilância epidemiológica para de forma atuante e confiável definir as ações de prevenção e controle da doença. Os estudos de Rolim e cols (2006) demonstraram que a reduzida procura pelo diagnóstico laboratório da raiva deve-se ao complicado envio das amostras, cujas dificuldades estão relacionadas com a coleta do cérebro, acondicionamento e transporte dos animais inteiros, ou cabeças para o laboratório. Como solução, os resultados do presente experimento recomendam a utilização de medula cervical como material para o diagnóstico laboratorial da Raiva.

No período de 1880 a 1885, Louis de Pasteur realizou trabalhos com a medula de animais raivosos por ser mais confiável e de fácil manipulação, a partir da qual fixou e inativou vírus da Raiva produzindo a primeira vacina anti-rábica (SANOFI PASTEUR, 2005). Resultados semelhantes foram encontrados nesse estudo, cuja localização e anatomia da medula cervical facilitaram sua coleta, e conseqüentemente o acondicionamento, transporte e estocagem com redução dos riscos de infecção comuns na manipulação de materiais inadequados; estas qualidades somadas aos seus resultados fidedignos e incontestáveis, tornam factível sua utilização de forma rotineiro como material de escolha para o diagnóstico laboratorial da Raiva.

8. CONCLUSÕES

A medula cervical é tão eficaz quanto o cérebro para ser utilizada como material de eleição no diagnóstico de rotina da Raiva.

A medula cervical é mais fácil de ser coletada, acondicionada e transportada para o laboratório do que o cérebro.

9. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesse experimento possam ser utilizados pelo Programa Nacional de Controle da Raiva, indicando a medula cervical como material de rotina para o diagnóstico laboratorial da Raiva em cães, gatos e animais silvestres, contribuindo com a epidemiologia e o controle da doença.

Pesquisas devem ser realizadas com o objetivo de desenvolver técnicas seguras de coleta, acondicionamento e transporte de amostras, assim como, identificar qual a região do SNC é mais apropriada para o diagnóstico laboratorial da Raiva em cães, gatos e animais silvestres.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. 2 ed. Washington, DC: OPAS, 1986 (Publicação Científica, 503). Raiva, p. 502 -526.

ATANASIU, P.; SUREAU, P. R. - In: **Encyclopédic Médico Chirurgicale**. Paris, EditionsTechniques, 1987. v.7 p.8065 Cap 10.

BAER, G. M.; SMITH, J. S. **Rabies in no hematophagous bats**. In: BAER, G. M. The natural history of rabies. New York, Academic Press, 1975. v.2., p.79 -97.

BELLOTO, A. J. Situação Epidemiológico da Raiva: panorama mundial. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL PROGRAMA DE TRATAMENTO “CONTROLE DE ZONOSSES E AS INTERAÇÕES HOMEM – ANIMAL”. Embu – SP, 2001. **Anais...** p. 26 – 28, 2001.

BENMANSOUR, A.; LEBLOIS, H.; COULON, P.; TUFFEREAU, C.; GAUDIN, Y; FLAMAND, A.; LAFAY, F. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. **Journal of Virology**, v.65, p.4198-203, 1991.

BINGHAM, J.; VAN DER MERWE, M. Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. **Journal of Virology Methods**, v.101, p. 85–94, 2002.

BOURHY, H.; SUREAU, P.; TORDO, N. From rabies to rabies-related viruses. **Veterinary of Microbiology**, v.23, p.115-28, 1990.

CARRIERI, M. L.; PEIXOTO, Z. M. P.; PACIENCIA, M. L. B.; KOTAIT, I.; GERMANO, P. M. L. Laboratory diagnosis of equine rabies and its implications for human postexposure prophylaxis. **Journal of virological methods**. Instituto Pasteur de São Paulo - SP, 2006.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Human Rabies** – Washington. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. v.44, 1995.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Investigation of rabies infection in organ donor and transplant recipients** – Alabama, Arkansas, Oklahoma, and Texas. MMWR Morb Mastal Wkly Rep. 16; v.53, n.27, p. 615 – 616, 2004.

CHARLTON, K. M. The pathogenesis of rabies. In: CAMPBELL, J. B; CHARLTON, K. M. (Eds), **Rabies**. Boston : Kluwer Academic Publishers, 1988.

CHAVEZA, J. H.; LEALB, P. C.; YUNESB, R. U.; NUNESB, R. J.; BARARDIC, C. R.M.; PINTOA, A. R.; SIMÕES, C. M. O.; ZANÉTTIA, C, R. In: **Avaliação da atividade antiviral da combinação de phenolic e derivados contra o vírus da raiva**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

COLL, J. M. The glycoprotein G of Rhadoviruses, **Archive of Virology** , v.140, p. 827–851, 1995.

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

ELKHOURY, M. R.; MAIA, A. N. S; PHEBO, L. **Aspectos Epidemiológicos da Raiva Humana no Brasil – 1998 a 2000**. Relatório Técnico, 2002, 22 p.

FISHBEIN, D. B.; ROBINSON, L. E. Current concepts: Rabies. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 1632–1638, 1993.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde - **Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica**, 5. ed., 1998.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde - **Norma Técnica de Tratamento Profilático Anti – Rábico Humano**. 1. ed. – Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2002.

GERMANO, P. M. L.; SILVA, E. V; CORDEIRO, C. F.; PRETO, A.A. Vacina anti-rábica PV/BHK com avridine como adjuvante: avaliação da eficácia em camundongos. **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, v.33, p. 865-878, 1990.

GERMANO, P. M. L.; MIGUEL, O.; ISHIZUKA, M.M.; SILVA, E. V. Avaliação de três cepas de vírus rábico, antigenicamente distintas, em camundongos. I – Estudo dos períodos de observação clínica. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, n.5, p. 375 - 83. São Paulo, 1998a.

GERMANO, P. M. L.; SILVA, E. V; MIGUEL, O.; ISHIZUKA, M.M. Avaliação de três cepas de vírus rábico, antigenicamente distintas, em camundongos. II – Estudo da disseminação viral por diferentes órgãos. **Revista de Saúde Pública**, v 22. n.6, p. 1-11, São Paulo, 1998b.

GOMES, F. J.; ROLIM, B. N. Avaliação epidemiológica do comportamento da raiva humana no município de Fortaleza-CE, no período de 2000 a 2003. In: **Temas em saúde da família - práticas e pesquisas**. Fortaleza: Ed. UECE. v.1, 2005. 332p.

HEUSCHELE, W. P. Rabies and other viral diseases. **Vet Clin North Am: Food Anim Pract**, v.3, n.1, p.45-59, 1987.

HOSTNIK, P.; BIDOVEC,.; MAGANJA, B.; GROM, J. Rabies: doubtful case

MORAIS, N. B. **Proteção oferecida por vacina antirábica humana contra uma cepa dos vírus da raiva isolados de primatas calitriquídeos no estado do Ceará - Brasil.** (Mestrado em saúde pública) – Departamento de saúde comunitária, 2003. 99f. Dissertação. Universidade Federal do Ceará – UFC. Fortaleza, 2003.

MORENO, J. O. **O perfil epidemiológico da Raiva urbana em Fortaleza e os desafios ao seu controle.** 2002. 70p. Dissertação (Conclusão de curso) – Medicina veterinária, Universidade Estadual do Ceará – UECE, Fortaleza, 2002

MORENO, J. O. **Diagnóstico laboratorial do vírus da Raiva.** Universidade Estadual do Ceará, curso de especialização em bioquímica e biologia molecular. Fortaleza – Ceará. 2007. p.6.

MUHAMUDA, K.; MADHUSUDANA, S. N.; RAVI, V.; DESAI, A. Presence of rabies specific immune complexes in cerebro-spinal fluid can help in ante-mortem diagnosis of human paralytic rabies, **Journal of clinical virology**, nº 30. 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS/ WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert committee on rabies.** Geneva. Eighth Repot. Ser. 824. 88p. 1992.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE –OMS/WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Consultation on rabies.** Geneva, Switzerland, 2005.

OPAS, ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Vigilância epidemiológica de la rabia em las Américas.** In: Boletim de Vigilância Epidemiológica de la Rabia em las Américas, v. 28, 1996. 28p.

OPAS, ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Eliminación de la rabia humana transmitida por perros en América Latina:** Análisis de la situación, ano 2004. Washington, D.C: OPS, 2005.

PALÁCIO, A. R.S. **Perfil epidemiológico da Raiva silvestre no estado do Ceará e desafios ao seu alcance.** 2003. 103p. Dissertação (Conclusão de curso) – Medicina veterinária, Universidade Estadual do Ceará – UECE, Fortaleza, 2003.

PENA, G. O. **Doenças infecciosas e parasitárias.** Ministério da saúde: Fundação nacional de saúde. Brasília/DF, 2º Ed. 1998. 220p.

PEIXOTO, Z. M.P.; CUNHA, E. M.S.; SACRAMENTO, D.; SOUSA, M. C. M.; QUEIROZ da SILVA, L. H.; GERMANO, P.M.L.; KOTAIT, I. Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. *Braz. J. Microbiol.* v.31, p.72-75, 2000.

PERL, D. P.; GOOD, P. F. **The pathology of rabies in the central nervous system.** In: Baer, G. M. (Ed.). *The Natural History of Rabies*, 2ª Ed. CRC Press, Boca Ratón. p. 164-188. 1991.

PROMED, PROGRAM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES. **China, raiva em seres humanos e caninos**. <<http://www.isid.org>> Data, 12 Dec 2006. Fonte, A China diariamente em linha, Dec 2006. Editado <<http://www.chinadaily.com/en/china/12/12/2006>>.

RELATÓRIO ANUAL DA COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE CONTROLE DA RAIVA-CE, 2006. Secretaria da saúde do Estado do Ceará. Fortaleza-CE, 2006.

ROLIM, Benedito Neilson. Avaliação da incidência de raiva no estado do Ceará no período de 1990 a 2003. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 37, p.396, 2004.

ROLIM, Benedito Neilson. **Avaliação dos casos de raiva humana transmitida por cães: na América Latina, no Brasil, no Ceará e em Fortaleza, no período de 1990 a 2003**. In: II Feira de Ciência, Cultura, Tecnologia e Inovação do Estado do Ceará, no período de 19 a 23 de junho de 2006. Anais publicados pela Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza – Ceará, Brasil. 2006.

ROLIM, Benedito Neilson.; TEIXEIRA, M. F. S.; ROLIM, J. B. S.; SOUSA, J. B.; Relato do controle da raiva canina no município de Fortaleza – Ceará, no período de 2001 a 2005. In: II FEIRA DE CIÊNCIA, CULTURA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO DO ESTADO DO CEARÁ, no período de 19 a 23 de junho de 2006. **Anais...** Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil. 2006.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; CUMMINS, L. B.; KOPROWSKI, H. Primate responses to a vaccinia - abies glycoprotein recombinant virus vaccine. **Vaccine**, v.10, p.368-74, 1992.

SANOFI PASTEUR. **VERORAB: The rabies vaccine you can trust**. Product Monograph be Sanofi Pasteur, The vaccines business of sanofi-aventis group. Lyon France, 2005.

SCHNEIDER, M. C., SANTOS-BURGOA , C. A historical review of the treatment of human rabies. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n.6, p.1-16, São Paulo, dez., 1994.

SESA – CE. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, coordenação do programa estadual de controle da Raiva. **Informe Técnico – Relatório 2004**. Ceará, 2004.

SESA – CE. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Coordenação do programa estadual de controle da Raiva. **Informe Técnico – Relatório 2006**. Ceará, 2006.

SILVA, R. A.; SILVA, N. M. Infecção rábica em cão com presença de vírus virulento nas glândulas salivares e avirulência no encéfalo. **Pesq. Agrop. Bras. Ser. Vet.** v.8, p.89-90, 1973.

SILVA, R. A.; SILVA, N. M.; MENEZES, P, R. V. Ocorrência do vírus da raiva na medula e no bulbo de eqüinos na doença natural e sua ausência nas diferentes regiões do sistema nervoso central e outros tecidos. **Pesq. Agrop. Bras., Ser. Vet.** v.9, p.29-31, 1974.

SILVA, R. A. **Evolução Histórica da Raiva.** In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA. São Paulo, Brasil. 2000.

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

TORDO, N.; CHARLTON, K.; WANDELER, A. I. Rhabdoviruses: Rabies. **Microbiology and microbial infections**, v. 1, p. 665 - 692. 1998.

TORDO, N. Phylogeny Lyssavirus genus. In: RABIES IN THE AMERICAS. XVII REUNIÃO INTERNACIONAL DE RAIVA NAS AMÉRICAS, **anais...**, Ministério da Saúde – Brasil, 2006. 220p.

TOLLIS, M.; DIETZSCHOLD, B.; VOLIA, C.B.; KOPROWSKI, H. Immunization of monkeys with rabies ribonucleoprotein (RNP) confers protective immunity against rabies. **Vaccine**, v.9 p.134-6, 1991.

TSIANG, H. Rabies virus infection of myotubes and neurons as elements of the neuromuscular junction. **Rev. Infect. Dis.**, v.10, p.733-8, 1988.

TSIANG, H; CECCALDI, P.E.; LYCKE, E. Rabies vírus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons. **J. Gen. Virol.**, 1991.

UBOL, S.; HIRIOTE, W.; ANUNTAGOOL, N.; UTAISINCHAROEN, P. Radical form of nitric oxide suppresses RNA synthesis of rabies virus. **Virus Res.**, v. 81 , p. 125 - 132, 2001.

VERONESI, R; FOCACCIA, R. In: **Tratado de Infectologia** – São Paulo, v.2, Ed. Atheneu, 1997, 1764p.

WANDELER, A.I., DAVIS, N., TINLINE, R.R., RUPRECHT, C.E. **Rabies epidemiology: some ecological and evolutionary perspectives.** P.297-322, 1994.

WARRILOW, D.; SMITH, IL.; HARROWER, B; SMITH, G.A. Sequence analysis of na isolate from a fatal human infection of Australian bat lyssavirus. **Virology**, v.297, p. 109–19, 2002.

WHO - WORLD HELTH ORGANIZATION. **Report of sixth WHO consultation on monoclonal antibodies in rabies diagnosis and research.** Geneva: World Health Organization (WHO/Rab.Res./90.34). 1990.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of sixth WHO consultation on monoclonal antibodies in rabies diagnosis and research.** Geneva: World Health Organization (WHO/Rab.Res./90.34). 1996.

WIDDOWSON et al., .Epidemiology of Urban Canine Rabies, Santa Cruz, Bolivia,1972-1997. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.5, 2002.

WU, X.; GONG, X.; FOLEY, H. D.; SCHNELL, M. J.; FU, Z. F. Viral transcription and replication are reduced when the rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated. **J Virol.**, v. 76, p. 4153 – 4161, 2002.

WUNNER, W.H. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Trends Neurosci**, v.12, p.413-415, 1982.

XIANG, Z. Q.; SPITALNIK, S. L. Immune responses to nucleic acids vaccines to Rabies virus, **Virology**, v. 209, p. 569 – 579, 1995.

ZHANG, Yong-Zhen; XIONG, Cheng-Long; XIAO, Dong-Lou; JIANG, Ren-Jie; WANG, Zhao-Xiao; ZHANG, Liang-Zhu; FU, Zhen F. , Human Rabies in China, **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.12, 2005.

ANEXOS

ANEXO A

2ª ETAPA: Cronograma de Execução, Inoculados dos Subgrupos 1 e 2.

RATO – I Mat. coletado	Subgrupos 1 e 2	DATA		PERÍODO	
		Inoculação	Óbito	Incubação	Clínico
Cérebro	R1- C	01/03/2007	09/03/2007	6	2
	R2 - C	01/03/2007	09/03/2007	6	2
	R3 - C	01/03/2007	11/03/2007	7	3
	R4 - C	01/03/2007	13/03/2007	8	3
	R5 - C	01/03/2007	13/03/2007	8	4
Medula cervical	R1 - M	01/03/2007	08/03/2007	5	2
	R2 - M	01/03/2007	09/03/2007	5	3
	R3 - M	01/03/2007	10/03/2007	7	2
	R4 – M	01/03/2007	11/03/2007	7	3
	R5 - M	01/03/2007	12/03/2007	8	3

MPI - Média do período de incubação: com cérebro = 7 dias; com medula = 6,8 dias.

MPC - Média do período clínico: com cérebro = 2,8; com medula = 2,6 dias.

ANEXO B

Cronograma de Execução, Inoculados dos Subgrupos 3 e 4.

RATO – II. Mat. coletado	Repetições	DATA		PERÍODO		
		Inoculação	Óbito	Incubação	Clínico	
rebro	Cé	R1 - C	01/03/07	08/03/2007	6	2
	R2 - C	01/03/07	08/03/2007	4	3	
	R3 - C	01/03/07	09/03/2007	5	3	
	R4 - C	01/03/07	10/03/2007	6	3	
	R5 - C	01/03/07	12/03/2007	8	4	
Medula cervical	R1 - M	01/03/07	08/03/2007	5	2	
	R2 - M	01/03/07	09/03/2007	5	3	
	R3 - M	01/03/07	09/03/2007	6	2	
	R4 - M	01/03/07	10/03/2007	6	3	
	R5 - M	01/03/07	11/03/2007	7	3	

MPI - Média do período de incubação: com cérebro = 5,8 dias; com medula = 5,8 dias.

MPC - Média do período clínico: com cérebro = 3; com medula = 2,6 dias.

ANEXO C

Cronograma de Execução, Inoculados dos Subgrupos 5 e 6.

RATO – III. Mat. coletado	Repetições	DATA		PERÍODO	
		Inoculação	Óbito	Incubação	Clínico
Cérebro	R1- C	20/03/2007	28/03/2007	5	3
	R2 - C	20/03/2007	28/03/2007	6	2
	R3 - C	20/03/2007	30/03/2007	7	3
	R4 - C	20/03/2007	31/03/2007	8	3
	R5 - C	20/03/2007	31/03/2007	7	4
Medula cervical	R1 - M	20/03/2007	28/03/2007	6	2
	R2 - M	20/03/2007	29/03/2007	6	3
	R3 - M	20/03/2007	29/03/2007	7	2
	R4 – M	20/03/2007	30/03/2007	7	3
	R5 - M	20/03/2007	30/03/2007	6	4

MPI - Média do período de incubação: com cérebro = 6,2 dias; com medula = 6,4 dias.

MPC - Média do período clínico: com cérebro = 3; com medula = 2,8 dias.

ANEXO D

Cronograma de Execução, Inoculados dos Subgrupos 7 e 8.

RATO – IV. Mat. coletado	Repetições	DATA		PERÍODO	
		Inoculação	Óbito	Incubação	Clínico
Cérebro	R1- C	31/03/2007	07/04/2007	5	2
	R2 – C	31/03/2007	09/04/2007	6	3
	R3 – C	31/03/2007	09/04/2007	7	2
	R4 – C	31/03/2007	11/04/2007	7	4
	R5 – C	31/03/2007	11/04/2007	8	3
Medula cervical	R1 – M	31/03/2007	08/04/2007	5	3
	R2 – M	31/03/2007	08/04/2007	5	3
	R3 – M	31/03/2007	08/04/2007	6	2
	R4 – M	31/03/2007	10/04/2007	7	3
	R5 – M	1/03/2007	10/04/2007	7	3

MPI - Média do período de incubação: com cérebro = 6,6 dias; com medula = 6 dias.

MPC - Média do período clínico: com cérebro = 2,8; com medula = 2,8 dias.

ANEXO E

Cronograma de Execução, Inoculados dos Subgrupos 9 e 10.

RATO – V. Mat. coletado	Repetições	DATA		PERÍODO	
		Inoculação	Óbito	Incubação	Clínico
Cérebro	R1- C	31/03/2007	08/04/2007	6	2
	R2 – C	31/03/2007	08/04/2007	5	3
	R3 – C	31/03/2007	09/04/2007	6	3
	R4 – C	31/03/2007	09/04/2007	7	2
	R5 - C	31/03/2007	11/04/2007	7	4
Medula cervical	R1 - M	31/03/2007	08/04/2007	5	3
	R2 - M	31/03/2007	09/04/2007	7	2
	R3 - M	31/03/2007	10/04/2007	7	3
	R4 – M	31/03/2007	10/04/2007	6	4
	R5 - M	31/03/2007	11/04/2007	7	4

MPI - Média do período de incubação: com cérebro = 6,2 dias; com medula = 6,4 dias.

MPC - Média do período clínico: com cérebro = 2,8; com medula = 3,2 dias.

**MGPI – Média Geral do Período de Incubação: com cérebro = 6,36;
e com a medula = 6,2.**

**MGPC – Média Geral do Período Clínico: com cérebro = 2,88;
e com a medula = 2,8.**

R648m	<p>Rol m, Bened to Ne lson Medula cerv cal como mater al para d agnóst co laborator al da ra va/Bened to Ne lson Rol m.-Fortaleza, 2007. 92p. Or entadora: Profª Drª Mar a Fát ma da S lva Te xe ra D ssertação (Mestrado Acadêm co em C ênc as Veter nár as)-Un vers dade Estadual do Ceará, Faculdade de Veter nár a 1.Ra va. 2. D agnóst co Laborator al. 3. Medula cerv cal. I. Un vers dade Estadual do Ceará; Faculdade de Veter nár a.</p> <p>CDD:</p>
-------	---

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)