

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**TESTE BIOLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO DA RAIVA
BOVINA: AVALIAÇÃO DE MODELO ANIMAL**

MARISE MARINELLI BONILHA

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL
FEVEREIRO DE 2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**TESTE BIOLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO DA RAIVA
BOVINA: AVALIAÇÃO DE MODELO ANIMAL**

MARISE MARINELLI BONILHA

Orientadora: **Profa. Dra. Maria Araújo Teixeira**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL
FEVEREIRO DE 2006

B715t Bonilha, Marise Marinelli
Teste biológico para o diagnóstico da raiva bovina : avaliação de modelo animal / Marise Marinelli Bonilha. -- Campo Grande, MS, 2006.
48 f. ; 30 cm.

Orientador: Maria Araújo Teixeira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

1. Bovino - Doenças. I. Teixeira, Maria Araújo. II. Título.

CDD (22) - 636.20896

Catálogo na publicação: Divisão de Processamento Técnico da Coordenadoria de Biblioteca Central da UFMS.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aproveitemos a luta e a dificuldade que a experiência nos oferece, cada dia, e habilitar-nos-emos a converter as sombras da antiga animalidade, que muitas vezes ainda nos domina, em luz da espiritualidade santificante para a nossa ascensão à vida excelsa.

Não nos cansemos de aprender, entendendo que o progresso da alma é infinito, no espaço e no tempo.

Francisco Cândido Xavier – Emmanuel

Dedico...

Aos meus pais Arari e José
Pelo amor, dedicação, exemplos... Por tudo.

Aos meus filhos Guilherme e Alexandre
Por serem a razão de minha vida.

E a você, Mitsuji,
Por existir em minha vida.

AGRADECIMENTOS

*Aqueles que passam por nós,
Não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si,
Levam um pouco de nós.*

Antoine de Saint – Exupéry

A DEUS e seus mensageiros por me sustentarem nos momentos difíceis.

Aos meus queridos pelo conforto e força nas horas em que precisei.

A minha orientadora, querida amiga Profa. Dra. Maria Araújo Teixeira por todo o empenho e paciência que me proporcionaram desenvolver e concluir este trabalho.

Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos por me fazerem lembrar do porquê de tudo isso.

Aos meus amigos da IAGRO, principalmente a Gladys, Leticia e pessoal da GDSA, pelo apoio e incentivo.

Aos amigos de longas datas Marli, Balbina, Braga, Papi, Rute, que além de incentivar colaboraram com o desenvolvimento da pesquisa.

Ao pessoal do laboratório da IAGRO, principalmente Leila, Daniela, Dona Maria, Paulo Roberto pelo auxílio nos testes e cuidados com os animais.

Ao colega Ademar Etiro Mori por todo o apoio à pesquisa.

Aos funcionários do biotério da UFMS, principalmente Maria, dona Dalci, Ingrid, Telma pelo carinho e apoio.

A Méd. Veterinária Elane Fabrício de Jesus e Dra. Lenice Heloísa Arruda Silva, amigas queridas, pelas correções, traduções e chateações.

A Profa. Dra. Ana Luiza Alves Rosa Osório pelas sugestões e empréstimo de bibliografia.

Aos colegas de mestrado pelo companheirismo na jornada.

Aos coordenadores e professores do mestrado pelo aprendizado e colaboração.

Ao Prof. Dr. Valter Joost van Onselen pelo apoio e exemplo de profissionalismo e caráter.

A Marilete por segurar todas as “barras” e mais algumas.

A Dra. Sílvia Massironi, do biotério central da USP, pelo fornecimento dos camundongos isogênicos.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, pelo apoio financeiro.

A Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO), por viabilizar a execução do projeto.

SUMÁRIO

	“Página”
1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 ETIOLOGIA.....	11
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	12
1.2.1 Ocorrência	12
1.3 TRANSMISSÃO	13
1.3.1 Vetores animais	14
1.3.2 Disseminação sazonal.....	15
1.4 PATOGÊNESE	15
1.5 SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS EM BOVINOS E MODELOS EXPERIMENTAIS	15
1.5.1 Bovinos.....	15
1.5.2 Modelos experimentais.....	16
1.6 DIAGNÓSTICO.....	16
1.6.1 Testes laboratoriais <i>post-mortem</i>	17
1.6.2 Testes <i>ante-mortem</i>	22
1.7 IMPORTÂNCIA DA ENFERMIDADE.....	22
REFERÊNCIAS	24
ARTIGO	Erro! Indicador não definido.
Modelo animal para o teste biológico no diagnóstico da raiva bovina	29
1. Introdução.....	30
2. Materiais e Métodos	32
2.1 <i>Animais</i>	32
2.2 <i>Tratamentos</i>	33
2.3 <i>Fator material</i>	33
2.4 <i>Ambiente</i>	34

2.5	<i>Material biológico</i>	35
2.6	<i>Preparo do material biológico</i>	35
2.6.1	<i>Para o teste biológico</i>	35
2.6.2	<i>Para o teste de imunofluorescência</i>	35
2.7	<i>Testes</i>	35
2.7.1	<i>Teste biológico- Inoculação intracerebral em camundongos (IIC)</i>	35
2.7.2	<i>Teste de imunofluorescência (IF)</i>	36
2.8	<i>Análise estatística</i>	36
3.	<i>Resultados</i>	37
4.	<i>Discussão</i>	41
5.	<i>Conclusões</i>	44
	<i>Agradecimentos</i>	46
	<i>Referências</i>	46

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma das mais relevantes enfermidades transmitidas ao homem pelos animais. Caracteriza-se por uma encefalite infecciosa e acomete praticamente todos os mamíferos: carnívoros, felídeos, quirópteros, roedores, herbívoros e primatas (Acha e Szyfres, 1986). Essa doença é de evolução fatal e, embora seja conhecida e estudada há mais de quatro mil anos, muitos dos seus aspectos ainda devem ser pesquisados, apesar dos significantes progressos científicos nas últimas décadas.

A raiva dos animais silvestres é um perigo constante para o homem e para os animais domésticos. Os animais silvestres ao contraírem a enfermidade aproximam-se de habitações e podem vir a agredir pessoas e animais. Dos herbívoros contaminados pelos animais silvestres, tanto na Europa como nas Américas, a principal espécie a ser atingida é a bovina (Acha e Szyfres, 1986).

No Brasil, somente no início do século passado, Carini (1911) levantou a hipótese de serem os morcegos hematófagos os transmissores da raiva para herbívoros. Segundo Kotait (1996), a hipótese de Carini e Parreiras Horta não foi aceita pela comunidade científica internacional, que a considerou uma “fantasia tropical”. Em 1908 ocorreu um surto no Sul do país que resultou na perda de quatro mil bovinos e mil eqüinos. Somente em 1925, Haupt e Rehaag (1925) confirmaram as observações de Carini e Parreiras Horta, pois identificaram, ao diagnóstico histológico do sistema nervoso central dos bovinos afetados, os corpúsculos de Negri – inclusões virais – que, quando encontrados no citoplasma de neurônios, são característicos da doença.

No Brasil, no período de 1980 a 1991, os morcegos foram responsáveis por 5,2% dos casos de raiva humana; 52 de um total de 991 casos (Germano, 1994). No ano de 2001 foram confirmados 3.243 casos de raiva, dos quais 2.157 (66%) ocorreram em bovídeos (Intervet, 2005).

O Estado de Mato Grosso do Sul tem suas atividades econômicas fundamentadas na agropecuária e é detentor de um dos maiores rebanhos bovinos do Brasil, com cerca de vinte e quatro milhões e quinhentos mil bovinos (Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal, 2004). A grande diversidade de animais silvestres, que são vetores em potencial da raiva, favorece a probabilidade de disseminação e manutenção do vírus rábico no Estado.

O diagnóstico da raiva necessita ser rápido e preciso, pois cerca de 30% dos animais e das pessoas infectados com o vírus desenvolvem sintomas da enfermidade (Bier, 1990). Esse dado é relevante porque, uma vez iniciados, os sintomas culminam com a morte da pessoa ou animal em praticamente 100% dos casos (Acha e Szyfres, 1986; Milius et al., 2004; World Health Organization, 2004).

1.1 ETIOLOGIA

A raiva é causada por um vírus com ácido ribonucléico (RNA vírus), pertencente à ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae, gênero *Lyssavirus* (Fenner et al., 1992), que apresenta forma de uma bala de revólver, com diâmetro de 75 nm e 100 a 300 nm de comprimento (Tordo e Poch, 1988; Murphy, 1991). O vírus possui um envelope formado por uma dupla camada fosfolipídica, associada à proteína M de membrana, que atua na regulação da replicação viral e à proteína G, responsável pela adsorção viral e por induzir à formação de anticorpos neutralizantes em indivíduos vacinados (Tordo e Poch, 1988).

A fita única de RNA está disposta em forma helicoidal e está associada à proteína L – proteína RNA – polimerase, responsável pela transcrição e replicação do genoma viral e a proteína N – proteína de nucleocapsídeo – importante no processo de encapsidação (Tordo et al., 1986; Tordo e Poch, 1988).

Por meio dos conhecimentos gerados pelo estudo de anticorpos monoclonais (MABs) e com o desenvolvimento de técnicas de engenharia genética e biologia molecular, a World Health Organization (1992) deixou de classificar os *Lyssavirus* por tipos de reações sorológicas – sorotipos de I a IV - e passou a classificá-los por avaliações antigênicas – genótipo I a VII.

O genótipo I compreende amostras clássicas do vírus da raiva – “vírus de rua” e

“vírus fixos” –, isolados de animais domésticos e silvestres e vírus isolados de morcegos das Américas. O genótipo II, correspondente ao vírus *Lagos bat*, isolado de morcegos frugívoros na África. O genótipo III é representado pelo vírus *Mokola*, isolado pela primeira vez de musaranho, que é um pequeno roedor, e depois do homem, de cães, de gatos e de roedores na África. O genótipo IV é representado pelo vírus *Duvenhage*, isolado de morcego insetívoro e do homem na África (World Health Organization, 1992).

Os genótipos V e VI são identificados como *European bat lyssaviruses* (EBL), EBL 1 e EBL 2, isolados de morcegos não hematófagos na Europa (Meredith et al., 1971; Brass, 1994). O genótipo VII corresponde a *Australian bat virus* (ABL), isolado de morcego não hematófago na Austrália (Gould et al., 1998). Arai et al. (2003) solicitaram a inclusão do genótipo VIII, *Aravan virus*, isolado de um morcego insetívoro na Ásia Central.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

1.2.1 Ocorrência

A raiva está distribuída em todos os continentes, com exceção da maior parte da Oceania. Atualmente, muitos países são livres da ocorrência de raiva, como Uruguai, Barbados e Jamaica, e várias ilhas do Caribe, Japão, Irlanda, Espanha, Portugal. É uma enfermidade que não tem distribuição uniforme nos países infectados e, mesmo neles, existem áreas livres, de baixa e de alta prevalência (Acha e Szyfres, 1986; Radostis et al., 2000).

Na Europa, a raiva silvestre é a mais importante manifestação da doença, e as raposas vermelhas são os principais vetores. Na África, embora a maioria dos países apresente ocorrência de raiva, segundo Radostis et al. (2000), a incidência é relativamente baixa em relação ao grande número de espécies de carnívoros selvagens.

Na América do Sul, como em outras regiões onde a raiva urbana já se encontra controlada, a raiva silvestre é o principal problema epidemiológico e econômico, atingindo em maior parte os bovinos (Radostis et al., 2000).

No Brasil, de acordo com Araújo (2005), a raiva já foi notificada em 22 estados, com diferenças importantes no controle da doença, de acordo com as peculiaridades de cada unidade federada. Em Mato Grosso do Sul, a raiva bovina já foi notificada em aproximadamente 25 dos 78 municípios que compõem o Estado (Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal, 2005).

1.3 TRANSMISSÃO

A forma mais comum de transmissão da doença para o homem e para os animais domésticos é por meio de contato com saliva de animal infectado pelo vírus da raiva, seja por mordeduras ou por lambeduras de mucosa ou de pele com solução de continuidade (Acha e Szyfres, 1986). Entretanto, Mori e Lemos (1998) relatam que a falta da enzima hialuronidase na saliva de bovinos torna-a espessa e pode ser a causa da pouca eficiência de transmissão da raiva por essa espécie.

As arranhaduras também têm potencial de infecção, por causa da salivação intensa dos animais doentes que muitas vezes contaminam suas patas.

Outras formas de contágio, embora raras, são: transplante de córnea, via inalatória, via transplacentária e aleitamento materno. Teoricamente, é possível a transmissão de raiva por contato íntimo intradomiciliar ou em unidades de saúde por meio de secreções infectantes. Entretanto, não há casos registrados com essa epidemiologia (Instituto Pasteur, 2004).

Koprowski (1995) relata que em casos de infecções por aerossóis, o vírus rábico penetra pelo epitélio da narina e pela mucosa oral, e é transportado para os neurônios do bulbo olfatório, onde provavelmente se replica, e é distribuído para outros neurônios do cérebro. Essa via é citada por Mori e Lemos (1998) como importante modo de transmissão entre morcegos hematófagos e de morcegos hematófagos para morcegos não hematófagos, principalmente por causa da pequena circulação de ar e grande concentração de vírus nas cavernas que habitam.

Constantine (1967 apud Mori e Lemos, 1998) descreve que outra forma de transmissão do vírus rábico entre morcegos é durante disputas entre machos por fêmea, que resultam em agressões em que o vírus pode ser transmitido. Esse tipo de transmissão pode

levar à contaminação de uma nova colônia, pois os machos vencidos, contaminados, têm o hábito de migrar para outra colônia.

1.3.1 Vetores animais

De acordo com Fernandes (1998), o tipo de vetor que transmite a raiva determina o quadro clínico da enfermidade no hospedeiro. Assim, existem dois ciclos distintos: a raiva urbana cujos vetores principais são cães e gatos domésticos e a raiva silvestre cujos vetores principais são os morcegos hematófagos e canídeos silvestres.

Aproximadamente, 85% das ocorrências de raiva em áreas urbanas são atribuídas, principalmente, à transmissão pela espécie canina. Em áreas rurais, além de cães e gatos, também são responsáveis pela transmissão da raiva: morcegos, macacos e mamíferos domésticos (Instituto Pasteur, 2004).

Em países onde a raiva urbana é bem controlada, a transmissão por animais silvestres, como as raposas, lobos, coiotes, morcegos hematófagos, morcegos insetívoros, morcegos frugívoros, guaxinins e esquilos, adquire maior importância (Radostis et al., 2000; Gomes, 2004).

Mori e Lemos (1998) relatam que em herbívoros a forma mais importante de transmissão é a mordedura por morcegos hematófagos. No Brasil existem três espécies de morcegos hematófagos: *Desmodus rotundus*, *Diaemus youngi* e *Diphyla ecaudata*. A espécie mais importante na transmissão da raiva herbívora no país é *D. rotundus*. Isso ocorre por causa de sua grande população, distribuída por todo o território nacional (Mori, 2002).

Morcegos frugívoros, insetívoros e outros não hematófagos, quando contaminados, também podem transmitir o vírus da raiva, principalmente por contatos acidentais. A raiva já foi diagnosticada em 27 de cerca de 140 espécies de morcegos existentes no Brasil (Fernandes, 1998).

Embora alguns autores defendam a existência de portadores assintomáticos entre os morcegos, não existe prova cabal dessa situação. No entanto, Mori (2002) citou uma situação que reforça a idéia de que morcegos infectados morrem da doença – o caráter

cíclico da enfermidade –, em que ocorre diminuição dos casos de raiva por diminuição do número de morcegos, seguido por um período de aumento de casos por causa do repovoamento das colônias de morcegos.

1.3.2 Disseminação sazonal

Normalmente, os surtos de raiva apresentam um caráter sazonal (Radostis et al., 2000). No Brasil, o aumento das disputas na época de acasalamento entre os morcegos ocorre principalmente na primavera (de setembro a dezembro), com conseqüente disseminação do vírus também para outras colônias. Assim, tem-se um aumento do número de casos de raiva bovina entre os meses de abril e junho (Mori e Lemos, 1998).

1.4 PATOGÊNESE

A replicação do vírus da raiva ocorre no local de inoculação, em células musculares. Progride para o sistema nervoso central por meio de células do sistema nervoso periférico, normalmente com o vírus avançando pelo citoplasma de axônios (Radostis et al., 2000). Uma vez alcançado o sistema nervoso central, o vírus atinge várias partes do cérebro e dissemina-se para outros órgãos do indivíduo, inclusive para as glândulas salivares (Germano, 1994).

Segundo Murphy e Bauer (1974), a primeira replicação do vírus nas células musculares se dá por causa da necessidade de os vírus estarem em um número suficiente para invasão do sistema nervoso.

1.5 SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS EM BOVINOS E MODELOS EXPERIMENTAIS

1.5.1 Bovinos

O período de incubação é normalmente de três semanas, mas pode chegar a vários meses. No início dos sintomas, os animais doentes se afastam do grupo, alguns apresentam midríase e excitabilidade, outros, sonolência e depressão (Instituto Pasteur, 2004).

A forma mais comum da raiva nos bovinos é um quadro de paralisia progressiva, que se inicia com dificuldade de caminhar, principalmente nos membros posteriores; cauda com flacidez ou desvio lateral e diminuição de sensibilidade, evoluindo para incoordenação, decúbito e morte. A forma furiosa, quando ocorre, apresenta um quadro de excitação, agressividade, hipersensibilidade a sons e movimentos, evoluindo também para incoordenação, paralisias e morte (Radostis et al., 2000; Leão e Souza, 2001).

1.5.2 Modelos experimentais

Coelhos

A infecção experimental em coelhos apresenta período de incubação de 15 a 20 dias e quadro de raiva paralítica, semelhante à dos bovinos (Bier, 1990).

Cobaias

Segundo Bier (1990), ao inocular experimentalmente solução contendo vírus rábico, por via intracerebral, observa-se período de incubação de oito a doze dias e sintomas da raiva furiosa, em que o animal apresenta excitação, atacando qualquer pessoa, animal ou objeto que estiver próximo.

Camundongos

Experimentalmente, os camundongos inoculados com o vírus da raiva apresentam período de incubação de oito a catorze dias. Os principais sintomas observados são: excitação, tremores, paralisia dos membros posteriores, paralisias generalizadas, prostração e morte, de nove a doze dias (Bier, 1990).

1.6 DIAGNÓSTICO

Para se obter o diagnóstico da raiva, devem ser realizados levantamento do histórico do caso, exame físico e exames laboratoriais.

Os resultados da análise laboratorial são imprescindíveis para confirmar a suspeita da enfermidade (Baer, 1975; Nilsson e Sugay, 1966a, 1966b), pois os sintomas da raiva

podem ser confundidos com outras encefalites. Zimmer et al. (1990) também afirmam que, geralmente, os sinais clínicos da raiva são variados e inespecíficos, e o apoio laboratorial é imprescindível para o diagnóstico correto.

Para Peixoto et al. (2000), o diagnóstico laboratorial da raiva é de extrema importância principalmente, nos casos em que não se conseguem distinguir clinicamente as causas das encefalites. As técnicas devem ser bem aplicadas, usando-se as recomendadas e levando-se em conta as limitações de cada prova. Segundo esses autores, os testes mais recomendados são: o de pesquisa de corpúsculos de Negri, o teste de imunofluorescência e o teste biológico.

1.6.1 Testes laboratoriais *post-mortem*

O material para análise laboratorial, sempre que possível, deve ser colhido de animais com morte espontânea, imediatamente após a morte do animal. Materiais oriundos de animais eutanasiados, principalmente se a eutanásia ocorrer no início da doença, podem resultar em resultados falso-negativos no teste de imunofluorescência e, em algumas vezes, no teste biológico, bem como na ausência de lesões significativas na histopatologia (Mori e Lemos, 1998).

Testes laboratoriais utilizados na rotina de diagnóstico

O primeiro teste desenvolvido para diagnóstico da raiva é fundamentado em pesquisa realizada por Negri em 1903, que observou estruturas intracitoplasmáticas nas células de tecidos nervosos de animais contaminados pelo vírus rábico (Kristensson et al., 1996). Foi descrita por Sellers e Fellow (1927) a técnica de coloração de corpúsculos de Negri – Técnica de Sellers –, que é feita com impressões de várias partes do cérebro, como hipocampo, cerebelo e bulbo, e coradas conforme descrita por esses autores, e observadas ao microscópio. A sensibilidade desse método está em torno de 75% a 93%, de acordo com a técnica e a experiência do observador.

O segundo teste de diagnóstico da raiva desenvolvido foi o teste biológico, descrito por Webster e Dawson (1935) como uma técnica de inoculação intracerebral de material biológico contaminado com vírus rábico em animal de experimentação. Nesse teste, o

material nervoso é triturado e diluído a 10% ou 20% em solução fisiológica e inoculado por via intracerebral em camundongos lactentes ou recém-desmamados (com 21 dias de idade). Observam-se aparecimento de sintomas característicos da raiva e morte por um período de até trinta dias. Depois da morte, retira-se o cérebro dos camundongos e realiza-se a prova de pesquisa de corpúsculos de Negri ou imunofluorescência.

Tierkel (1976), ao se referir às técnicas de pesquisa de corpúsculos de Negri e ao teste biológico empregados no diagnóstico laboratorial de raiva, recomenda que em casos de pesquisa de corpúsculos negativa se proceda à realização do teste biológico. O autor ressalta que apesar de a técnica de pesquisa de corpúsculos atender aos requisitos de rapidez e de economia tem-se observado que de 10% a 15% de materiais enviados para diagnóstico, que haviam sido negativos ao teste de pesquisa de corpúsculos, se apresentaram positivos no teste biológico.

Germano et al. (1977) confirmam que o teste biológico é o mais seguro de todos os testes para o diagnóstico de raiva. Apesar de sua importância, os autores citam que esse diagnóstico tem a desvantagem de ser demorado, pois depois de inoculado o material suspeito de estar contaminado, precisa-se esperar o desenvolvimento da sintomatologia e a morte do camundongo.

Após vários estudos experimentais, o camundongo foi escolhido como modelo animal a ser utilizado no teste biológico para o diagnóstico da raiva (Johnson, 1979; Sureau, 1986).

Tierkel (1976) relata que antes da utilização de camundongos, acreditava-se que cobaias e coelhos eram os animais mais apropriados para realização do teste biológico. Mas, após observar que camundongos ao serem inoculados por via intracerebral com o vírus da raiva sempre apresentavam um curso da enfermidade típico, eles passaram a ser os animais de escolha. Também Kaplan (1976) considera o camundongo como a espécie mais sensível à infecção pelo vírus da raiva.

Bier (1990) referiu-se à infecção experimental em cão, coelho, cobaia e em camundongo e destacou o camundongo como um animal extremamente sensível ao vírus da raiva.

Além da sensibilidade já citada, Souza e Merusse (1996) fizeram considerações

sobre as características que fazem dos camundongos ótimos modelos animais, tais como: ciclos vitais curtos, fácil manutenção, contenção, manipulação e observação, as quais permitem que se trabalhe com uma grande quantidade de indivíduos e permitem, ainda, a padronização do ambiente. Os autores destacam também a padronização genética desses animais, em razão de amplos estudos realizados na espécie.

Com o desenvolvimento de linhagens consangüíneas, possibilitou-se a realização de estudos científicos em que as únicas variáveis presentes fossem aquelas às quais o pesquisador estava testando. Esse grande avanço da genética resultou em utilização de menor número de animais e de menor número de repetições dos experimentos (Santos, 2002).

Atualmente, existem mais de 500 linhagens de camundongos isogênicos e, segundo Massironi (1996), as mais utilizadas são BALB/c, C57BL/6, DBA/2, CBA/J, A/J.

Santos (2002) descreve que à medida que o estudo de linhagens geneticamente padronizadas foi se estabelecendo, observou-se a facilidade de utilização de linhagens híbridas F1, que são produtos da primeira geração de cruzamentos entre duas linhagens isogênicas. Essas linhagens contemplam animais geneticamente homogêneos, mas, mais vigorosos, de taxa de crescimento maior e taxa de mortalidade menor, quando comparados aos animais das linhagens isogênicas.

A inoculação intracerebral em camundongos para isolamento do vírus ainda é uma dos testes mais úteis no diagnóstico da raiva. Recomendam-se camundongos de um a três dias de idade, porque são mais sensíveis que os animais mais velhos (Acha e Szyfres, 1986). No entanto, vários laboratórios têm preferido utilizar camundongos com 21 dias de idade, por causa da maior facilidade de manipulação.

O terceiro teste utilizado no diagnóstico da raiva de forma rotineira é o de imunofluorescência direta para pesquisa do vírus. Goldwasser e Kissling (1958) descreveram a técnica que até hoje é considerada padrão para diagnóstico laboratorial para a raiva (Bordignon e Zanetti, 2000). Esse teste, segundo Dean e Abelseth (1976), consiste de se fazer uma impressão de amostra de tecido nervoso do animal, em lâmina de microscopia, adicionada de uma substância fluorescente e observada ao microscópio.

Kaplan (1976) afirmou que a concordância dos resultados quando se usa

imunofluorescência direta e inoculação em camundongos pode se aproximar de 100%. E que o teste biológico deve ser realizado sempre que teste de imunofluorescência direta for negativo. Koprowski (1976) corroborou a idéia de que a técnica de inoculação intracerebral deve ser usada como confirmatória para o teste de imunofluorescência, pois possibilita a replicação viral no modelo animal e, assim, consegue detectar pequenas quantidades de vírus presentes no material testado.

Comparada à prova de pesquisa de corpúsculos, o teste de imunofluorescência direta é mais sensível que a pesquisa de corpúsculos, pois não há necessidade da presença dos corpúsculos de Negri e mesmo o vírus da raiva morto ou inativado pode ser detectado. Há, no entanto, raros casos em que os anticorpos da amostra se ligam aos vírus antes dos anticorpos fluorescentes, diminuindo a sensibilidade do teste (Correa e Correa, 1982).

Mesmo a imunofluorescência sendo considerada teste padrão para diagnóstico laboratorial, por apresentar resultado rápido, alta sensibilidade e especificidade; tem a sua eficácia dependente da competência do técnico e da qualidade do conjugado e de outros reativos. Por isso, recomenda-se que, pelo menos no primeiro ano após instalação desse teste no laboratório, seja feita em paralelo o teste de inoculação intracerebral em camundongos e, em casos de materiais negativos para raiva na imunofluorescência, também sempre se proceda o teste biológico (Acha e Szyfres, 1986).

Rudd e Trimarchi (1989) também relataram que, por causa da grande facilidade para realizar o teste de imunofluorescência, alguns laboratórios têm deixado de realizar o teste de inoculação em camundongos. Destacaram, porém, que a prática de se realizar o teste de inoculação para confirmar resultados da imunofluorescência é muito importante, principalmente em materiais em que há pequena quantidade de vírus, o que pode gerar reações falso-negativas na imunofluorescência.

O quarto teste de diagnóstico da raiva é a técnica de histopatologia realizada em tecidos nervosos fixados em formol. Essa técnica consiste de se observar ao microscópio cortes de tecido nervoso, corados normalmente pela hematoxilina eosina (HE), onde se pesquisam achados e alterações teciduais sugestivos da raiva como presença de corpúsculo de Negri ou lesões inflamatórias características de encefalite viral (Lépine, 1976). O teste histopatológico, embora nem sempre possa ser considerado conclusivo, pode servir como importante apoio no diagnóstico da raiva.

Em trabalho realizado por Langohr et al. (2003) em que utilizaram tecido nervoso positivo para a raiva nos testes de imunofluorescência ou no biológico, observaram trinta por cento de reações falso-negativas no teste de histopatologia.

Testes laboratoriais que ainda não são rotina no diagnóstico

Novas técnicas laboratoriais têm sido desenvolvidas, mas estão em fase de padronização e validação para o diagnóstico da raiva.

Fernandes (1998) e Radostis et al. (2000) citam a técnica de imuno-histoquímica, realizada em materiais conservados em formol, que permite detectar o antígeno viral nos casos em que tecidos frescos não estão disponíveis ou em que os testes padrões para o diagnóstico da raiva foram negativos.

Por causa de o vírus da raiva possuir a característica de se multiplicar em culturas de vários tipos de células, especialmente em células renais de hamster, em células de embrião de pinto (Bier, 1990), pesquisadores têm desenvolvido e estudado o teste de isolamento em cultivos celulares, principalmente quando o material contém pequena concentração de vírus da raiva. A técnica é sensível, apresentando aproximadamente 98% de correlação quando comparada aos resultados do teste de imunofluorescência (World Health Organization, 2004). Contudo, pode apresentar reação falso-negativa quando é usado cérebro em decomposição.

Alguns laboratórios estão usando o teste ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) para detectar o antígeno do nucleocapsídeo de *Lyssavirus*. Embora seja um teste rápido, sua utilidade até o momento compreende estudos epidemiológicos e não de diagnóstico (World Health Organization, 2004).

A despeito de novas técnicas moleculares emergentes de diagnóstico, o uso do teste de imunofluorescência direta em conjunto com o teste biológico continua como procedimento padrão para diagnóstico da raiva, por causa de sua alta sensibilidade e especificidade (Roehle et al., 2002).

Segundo World Health Organization (2004), o uso do teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) e de outras técnicas de amplificação gênica é muito importante para estudos epidemiológicos em laboratórios que têm procedimentos de controle de qualidade

e técnicos experientes nessas técnicas, mas ainda não são recomendadas para diagnóstico de rotina da raiva.

1.6.2 Testes *ante-mortem*

Alguns testes laboratoriais têm sido utilizados para diagnóstico da raiva em indivíduos suspeitos de terem se infectado com o vírus.

A técnica de imunofluorescência pode ser usada para teste em impressões corneais (Lopez et al., 1970; Côrtes e Oliveira, 1981), raspado de mucosa lingual ou saliva (Beauregard e Casey, 1969; Kissling, 1975), tecido de bulbo de folículos pilosos e cortes cutâneos congelados (Acha e Szyfres, 1986), de indivíduos vivos, suspeitos de infecção pelo vírus rábico. O teste, nesses casos, só pode ser considerado conclusivo quando tiver resultado positivo (Larghi et al., 1972; King e Turner, 1993).

Técnicas moleculares podem detectar o vírus da raiva em diversos fluidos biológicos, por exemplo, saliva, fluido cérebro-espinhal, biópsia de pele e urina. Essas técnicas, porém, ainda precisam ser padronizadas (World Health Organization, 2004).

1.7 IMPORTÂNCIA DA ENFERMIDADE

A importância da raiva para a saúde pública não é por causa do número de casos da enfermidade, mas da sua alta letalidade e dos seus danos econômicos, considerando-se horas/homem perdidas com o tratamento anti-rábico (Acha e Szyfres, 1986).

Raramente os animais pecuários constituem fontes de infecção, embora a transmissão da raiva para o homem possa ocorrer quando animais raivosos são manipulados. A enfermidade é considerada o maior risco ocupacional dos médicos-veterinários (Radostis et al., 2000).

Na América Latina, devem ser acrescentados os prejuízos anuais causados à pecuária pela raiva transmitida por morcegos hematófagos, especialmente aos rebanhos bovinos.

No Brasil, essa perda se aproxima de 15 milhões de dólares, com a morte de cerca

de 40.000 cabeças bovinas, e os prejuízos indiretos estão calculados em 22,5 milhões de dólares ao ano (Instituto Pasteur, 2004).

No Estado de Mato Grosso do Sul, segundo o Relatório do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Animais da Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO), no período de janeiro de 2000 a junho de 2005, de um total de 7.914 amostras remetidas ao laboratório de raiva, 1.259 (16%) eram de amostras provenientes de bovinos. Destas, 399 (32%) foram positivas para a raiva (Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal, 2005).

Estima-se que cerca de 2.000 bovinos pereçam de raiva por ano no Estado, no entanto, acredita-se que esses números sejam subestimados por dois motivos: primeiro, em um foco de raiva no qual existem várias mortes de bovinos, apenas materiais de alguns são remetidos para análise laboratorial, e segundo, quando em uma propriedade ocorre um foco de raiva, as propriedades vizinhas não remetem material para o laboratório e já tomam medidas de controle diretamente. Essas situações tanto geram quantidade subestimada de morte quanto elevam os prejuízos causados pela enfermidade, segundo Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (2004).

Diante do exposto, observando-se que um diagnóstico precoce pode levar a medidas sanitárias rápidas - que não só propiciem controle da enfermidade como também venham a evitar grandes prejuízos econômicos -, e considerando-se também, que o teste de inoculação em camundongos ainda é uma ferramenta essencial para o diagnóstico da raiva, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um modelo animal precoce e eficaz para realização do teste biológico de raiva bovina, verificando o efeito da linhagem, do sexo, da idade e do material de inoculação sobre o período de ocorrência da morte de camundongos.

REFERÊNCIAS

- Acha, P.N., Szyeres, B., 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organizacion Panamericana de la Salud, Washington.
- Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal, 2004. Relatório. Campo Grande, Mato Grosso do Sul.
- Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal, 2005. Relatório. Campo Grande, Mato Grosso do Sul.
- Arai, Y.T., Kuzmin, I.V., Kameoka, Y., Botvinkin, A.D., 2003. New *Lyssavirus* genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 333-337.
- Araújo, F.A.A., 2005. A situação da raiva no Brasil, URL: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br>
- Baer, G.M., 1975. Bovine paralytic rabies and rabies in the vampire bat. In: Baer, G.M., The natural history of rabies. Academic Press, New York, p. 1, pp. 155-175, pp. 387-454.
- Beaugerard, M., Casey, G.A., 1969. Demonstration of rabies antigen in salivary glands of rabies suspected animals. *Can. J. Comp. Med.* 33, 55-58.
- Bier, O., 1990. Microbiologia e imunologia. 30ª ed. Melhoramentos, São Paulo.
- Bordignon, J., Zanetti, C.R., 2000. Avanços no diagnóstico laboratorial da raiva no Brasil. Anais do Seminário Internacional de Raiva, 22-24 ago. 2000; São Paulo. São Paulo: Instituto Pasteur.
- Brass, D.A., 1994. Rabies in bats: natural history and public health implications. Livia Press, Redgefield, Connecticut.
- Carini, A., 1911. Su rune grande épizootie de rage. *Annales de L'Institut Pasteur, Paris.*
- Correa, W.M., Correa, C.N.M., 1982. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 3ª ed. Varela, São Paulo.
- Côrtes, V.A., Oliveira, M.C.G., 1981. Diagnóstico da raiva em cães a partir da saliva por imunofluorescência. *Arq. Inst. Biol. (São Paulo)* 48, 79-81.

- Dean, D.J., Abelseth, M.K., 1976, Prueba de los anticuerpos fluorescentes. In: Kaplan, M.M., Koprowski, H., La rabia técnicas de laboratorio. 4ª ed. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, pp. 88-97.
- Fenner, J.F., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Rott, R., Studdert, M.J., White, D.O., 1992. Virologia veterinária. Acribia, Zaragoza.
- Fernandes, C.G., 1998. Raiva. In: Riet-Correa, F., Schild, A.L., Méndez, M.D.C., Doenças de ruminantes e eqüinos. Ed. Universitária/UFPEL, Pelotas, pp. 118-130.
- Germano, P.M.L. Miguel, O., Chamelet, E.L.B., Morita, L.T.M.S., 1977. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo 14 (1), 133-141.
- Germano, P.M.L., 1994. Avanços na pesquisa da raiva. Rev. Saúde Pública 28, 86-91.
- Goldwasser, R.A., Kissling, R.E., 1958. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. Proc. Soc. Exp., Biol. 98, 219-223.
- Gomes, A.A.B., 2004. Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil. Tese, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- Gould, R.A., Hyatt, A.D., Lunt, R., Kahenbelt, J.A., Hengstberger, S., Blacksell, S.D., 1998. A novel *lyssavirus* isolated from Pteropid bats in Australia. Virus Res. 54, 165-187.
- Haupt, H., Rehaag, H., 1925. Raiva epizoótica nos rebanhos de Santa Catarina transmitida por morcegos. Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2, 17-47.
- Instituto Pasteur, 2004. Raiva, URL: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/online/online.htm>
- Intervet, 2005. Doenças animais, URL: <http://www.intervet.com.br/Doenças/Raiva>
- Johnson, H.N., 1979. Rabies virus. In: Lennete, E.H., Schmidt, N.J., Diagnosis procedures for viral and rickettsial diseases. 3ª ed. American Public Health Association, New York, pp. 356-380.
- Kaplan, M.M. 1976. Evaluation de las tecnicas de laboratorios aplicables al diagnostico y la prevencion de la rabia y a las investigaciones antirrabicas. In: Kaplan, M.M., Koprowski, H., La rabia técnicas de laboratorio. 4ª ed. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, pp. 19-26.
- King, A.A., Turner, G.S., 1993. Rabies a review. J. Comp. Pathol., 108, 1-39.
- Kissling, R.E., 1975. The fluorescent antibody test in rabies. In: Baer, G.M., The natural history of rabies. Academic Press, New York, pp. 401-406.

- Koprowski, H., 1976. Prueba de inoculación al raton. In: Kaplan, M.M., Koprowski, H., La rabia técnicas de laboratorio. 4ª ed. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, pp. 88-97.
- Koprowski, H., 1995. Visit to an ancient curse. *Am. J. Med. Sci.*, 2, 48-55.
- Kotait, I., 1996. Infecção de morcegos pelo vírus da raiva. *Boletim do Instituto Pasteur* 1, 51-58.
- Kristensson, K., Dastur, D.K., Manghani, D.K., Tsiang, H., Bentivoglio, M., 1996. Rabies: Interactions between neurons and viruses. A review of the history of Negri inclusion bodies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 22, 179-187.
- Langohr, I.M., Irygoyen, L.F., Lemos, R.A.A., Barros, C.S.L., 2003. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. *Ciência Rural Santa Maria* 33, 125-131.
- Larghi, O.P., González, E.L., Hold, J.R., 1973. Evaluation of the corneal test as a laboratory method for rabies diagnosis. *Appl. Microbiol.* 25, 187-189.
- Leão, J.A., Souza, S.H.V.C., 2001. Diagnóstico laboratorial da raiva. *Âmbito Cultura*, Rio de Janeiro.
- Lépine, P., 1976. Diagnostico histopatologico. In: Kaplan, M.M., Koprowski, H., La rabia técnicas de laboratorio. 4ª ed. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, pp. 58-65.
- Lopez, T.J.H., Alvarez, B.J., Gil, E.J., 1970. Diagnostico in vivo de la rabia humana por inmunofluorescência in córnea. *Antioquia Méd.* 20, 577-582.
- Massironi, S.M.G., 1996. Monitoração genética. In: Luca, R.R., Alexandre, S.R., Marques, T., Souza, N.L., Merussi, J.L.B., Neves, S.P. (Org.), *Manual para técnicos em bioterismo*. 2ª ed. H. A. Rothschild, São Paulo, pp. 149-155.
- Meredith, C.D., Prossouw, A.P., Koch, H.P., 1971. A unusual case of human rabies thought to be of chiropteran origin. *S. Afr. Med. J.* 45, 767-769.
- Milius, J., Jacevicius, E., Tamosicenas, V., Paulauskas, V., Lukauskas, K., 2004. Rabies among wild and domestic animals in Lithuania in 1993-2002: Epizootiology, diagnosis and vaccination. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 48, 195-200.
- Mori, A. E., 2002. Raiva. In: Lemos, R.A A., Barros, N., Brum, K.B. (Org.). *Enfermidades de interesse econômico em bovinos de corte: perguntas e respostas*. Editora UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, pp. 11-20.
- Mori, A. E., Lemos, R.A.A., 1998. Raiva. In: Lemos, R.A.A. (Org.), *Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul: reconhecimento e diagnóstico*. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, pp. 47-58.
- Murphy, F.A., 1991. Morphology and morphogenesis. In: Baer, G. M., *The natural history of rabies*. CRC Press, Boca Raton, pp. 33-36.

- Murphy, F.A., Bauer, S.P., 1974. Early street rabies virus infection in striated muscle and later progression to the central nervous system. *Intervirology* 3, 256-268.
- Nilsson, M.R., Sugay, W., 1966a. Diagnóstico da raiva: comparação entre a pesquisa de inclusões em esfregaços e a inoculação de camundongos. *Arq. Inst. Biol. (São Paulo)* (33), 11-16.
- Nilsson, M.R., Sugay, W., 1966b. O uso de camundongos lactentes no diagnóstico da raiva. *Arq. Inst. Biol. (São Paulo)* (33), 47-48.
- Peixoto, Z.M.P., Cunha, E.M.S., Sacramento, D.R.V., Souza, M.C.A.M., Silva, L.H.Q., Germano, P.M.L. et al., 2000. Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. *Braz. J. Microbiol.* 31 (1), 34-36.
- Radostis, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hincheliff, K.W., 2000. *Clínica veterinária*. 9ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Roehe, P.M., Schaefer, R., Pereira, A.S., 2002. Otimização da imunofluorescência direta para diagnóstico de raiva. *Acta Scientiae Veterinariae*, 30, 53-57.
- Rudd, R.J., Trimarchi, C.V., 1989. Development and evaluation of *in vitro* virus isolation procedure as a replacement for de mouse inoculation test in rabies diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 25 (8), 2522-2528.
- Santos, B.F., 2002. Classificação dos animais de laboratório quanto ao status genético. In: Andrade, A., Pinto, S.C., Oliveira, R.S. (Org.), *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 65-70.
- Sellers, T.F., Fellow, A.P.H.A., 1927. A new method for staining Negri bodies of rabies. *Am. J. Public Health* 17, 1080-1081.
- Souza, N.L., Merusse, J.L.B., 1996. A utilização de animais de laboratório. In: Luca, R.R., Alexandre, S.R., Marques, T., Souza, N.L., Merussi, J.L.B., Neves, S.P. (Org.), *Manual para técnicos em bioterismo*. 2ª ed. H. A. Rothschild, São Paulo, pp. 3-10.
- Sureau, P., 1986. Les techniques rapides de diagnostic de laboratoire de la rage. *Arch. Inst. Pasteur Tunis.* 63 (1), 183-197.
- Tierkel, E.S., 1976. Investigacion microscopica rapida de corpusculos de Negri y preparacion de muestras para las pruebas biológicas. In: Kaplan, M.M., Koprowski, H., *La rabia técnicas de laboratório*. 4ª ed. Organización Mundial de la Salud, Ginebra. pp. 42-53.
- Tordo, N., Poch, O., 1988. Structure of rabies virus. In: Campbell, J.B., Charlton, K.M. (Eds.), *Rabies*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 25-45.
- Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G., 1986. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome, segmented homology with VSV. *Nucleic Acids Res.* 14, 2671-2683.

Webster, L.T., Dawson, J.R., 1935. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation: measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 32, 570-573.

World Health Organization, 1992. Expert Committee on Rabies 8th Report. Geneva. (Technical Report Series, 824).

World Health Organization. 2004. WHO Expert Consultation on Rabies. Geneva.

Zimmer, K., Wiegand, D., Manz, D., Frost, J.W., Reinacher, M., Frese, K., 1990. Evaluation of five different methods for routine diagnosis of rabies. *J. Vet. Méd. B*, 37 (5), 392-400.

MODELO ANIMAL PARA O TESTE BIOLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DA RAIVA BOVINA

Marise Marinelli Bonilha^a, Maria Araújo Teixeira^b, Valter
Joost van Onselen^c

^a*Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO); Avenida
Filinto Müller, 1.146; Campo Grande, MS, Brasil, 79074-902. Endereço
eletrônico: marisemarinelli@iagro.ms.gov.br*

^b*Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS); Biotério
Central/Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS); Cx. Postal 549;
Campo Grande, MS, Brasil, 79070-900. araujo@nin.ufms.br*

^c*Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFMS; Departamento de
Zootecnia; Cx. Postal 549; Campo Grande, MS, Brasil, 79070-900. Endereço
eletrônico: onselen@nin.ufms.br*

Resumo

A raiva é uma zoonose de evolução fatal e clinicamente indistinguível de outras encefalites, e, por isso, é essencial sua confirmação laboratorial. Apesar de novas técnicas, seu teste conclusivo ainda é a inoculação em camundongo. O objetivo do presente estudo foi estabelecer um modelo animal experimental que permita um teste biológico mais precoce e eficaz da doença. Para tanto foram inoculados 57 camundongos de ambos os sexos — 31 híbridos (BALB/c x C57BL/6)F1 e 26 Swiss — com amostras positivas de cérebros bovinos, e comparados os períodos de ocorrência (dias) da morte dos camundongos. Os resultados demonstraram diferença significativa entre fêmeas F1 ($11,50 \pm 0,97$) e fêmeas Swiss ($15,71 \pm 2,56$). Para análise estatística empregou-se a análise de variância e o teste F de Fisher ($\alpha = 0,05$). Concluiu-se que as fêmeas de camundongos da linhagem híbrida (BALB/c x C57BL/6)F1 devem ser escolhidas como modelo experimental em substituição a fêmeas da linhagem Swiss para diagnóstico mais precoce no teste biológico quando o material de inoculação for cérebro de bovinos eutanasiados, e que o fato de o material de inoculação provir de bovinos eutanasiados ou que vieram a óbito pela enfermidade deve ser levado em conta na escolha do melhor modelo animal a ser indicado para o teste biológico da raiva.

Palavras-chave: Modelo animal; Camundongos; Teste biológico; Diagnóstico da raiva bovina

AN ANIMAL MODEL FOR THE INOCULATION TEST IN CATTLE RABIES DIAGNOSIS.

Abstract

Because rabies is a zoonosis with a fatal outcome and is clinically indistinguishable from other encephalites, laboratory confirmation is essential for its diagnosis. Despite the availability of new techniques, the conclusive test of rabies is still the mouse inoculation test (MIT). The purpose of the present study was to establish an experimental animal model that allows for an earlier and more effective biological test of the disease. For such, a total of 57 male and female mice—31 (BALB/c × C57BL/6) F1 hybrids and 26 Swiss—were inoculated with positive samples of bovine brain tissue and the numbers of days elapsed until death were compared. The results revealed a significant difference between F1 females (11.50 ± 0.97) and Swiss females (15.71 ± 2.56). Analysis of variance and Fisher's F test ($\alpha = 0.05$) were used for statistical analysis. In conclusion, female mice of the hybrid strain (BALB/c × C57BL/6) F1 should be chosen instead of Swiss female mice as experimental model for earlier diagnosis of rabies with MIT when the inoculation material consists of brain tissue from euthanized cattle. Also, the type of inoculation material (i.e., from euthanized cattle or from animals that died of the disease) should be taken into account when selecting the animal model to be adopted for the rabies inoculation test.

Keywords: Animal model; Mice; Mouse inoculation test; Cattle rabies diagnosis

1. Introdução

A raiva é uma encefalite viral cujos sintomas podem ser confundidos com os de outras encefalites. Portanto, os resultados da análise laboratorial são imprescindíveis para confirmar a suspeita da enfermidade (Baer, 1975; Nilsson e Sugay, 1966a, 1966b).

Por ser o diagnóstico laboratorial da raiva de extrema importância, as técnicas recomendadas devem ser bem aplicadas e levadas em conta as limitações de cada teste (Peixoto et al., 2000).

Dentre os testes de diagnóstico mais utilizados está o biológico, descrito por Webster e Dawson (1935) como uma técnica de inoculação intracerebral de material biológico contaminado com vírus rábico, em animal de experimentação. Até hoje é considerado o teste de diagnóstico conclusivo para a raiva, principalmente em materiais suspeitos que foram negativos em outros testes, como o de imunofluorescência direta (World Health Organization, 2004).

Germano et al. (1977) também se referem ao teste biológico como o mais seguro para o diagnóstico da raiva. Apesar de sua importância, os autores citam que esse método tem a desvantagem de ser demorado, pois é necessário esperar o desenvolvimento da sintomatologia e a morte do animal inoculado.

Após estudos experimentais em vários animais, o camundongo foi escolhido como modelo animal a ser utilizado no teste biológico para o diagnóstico da raiva, por se mostrar muito sensível ao vírus rábico (Kaplan, 1976; Bier, 1990).

Embora os camundongos sejam sensíveis ao vírus, apresentam um período de incubação de oito a catorze dias e morte, de nove a doze dias (Bier, 1990), que pode ser maior dependendo de alguns fatores como a quantidade de vírus presente no material testado (Mori e Lemos, 1998) e as reações individuais do camundongo inoculado. Até o momento, a linhagem de camundongo normalmente utilizado para esse fim é a Swiss, portadora de constituição genética desconhecida, que apresenta heterozigose de cerca de 99% (Santos, 2002).

Considerando as reações individuais de camundongos heterogênicos, a padronização genética desses animais foi possível em razão de amplos estudos realizados na espécie (Benavides e Guénet, 2003). Com o desenvolvimento de linhagens consanguíneas ou isogênicas, possibilitou-se a realização de estudos científicos em que as únicas variáveis presentes fossem aquelas as quais o pesquisador estava testando, ou seja, a variabilidade individual foi anulada (Santos, 2002).

Por causa da pequena prolificidade dessas linhagens, Santos (2002) também esclarece que se têm utilizado linhagens resultantes do primeiro cruzamento entre duas linhagens homozigotas chamadas de híbridas F1, que mantêm a característica de uniformidade entre os irmãos, mas são mais prolíferas e resistentes do que as linhagens homozigotas.

Ao se realizar o teste biológico para raiva, pode-se deparar com diversos fatores que, se presentes, diminuem a confiabilidade do teste. Dentre os fatores estão o estado de conservação da amostra (Albas et al., 1999), se a amostra é proveniente de animal que veio a óbito pela enfermidade ou de animal eutanasiado (Mori e Lemos, 1998) e as reações individuais dos camundongos (Benavides e Guénet, 2003), utilizados no teste.

Levando-se em conta que o teste de inoculação em camundongos ainda é uma

ferramenta essencial para o diagnóstico da raiva, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um modelo animal precoce e eficaz para a realização do teste biológico de raiva bovina, verificando o efeito da linhagem, do sexo, da idade e do material de inoculação sobre o período de ocorrência da morte de camundongos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados 57 camundongos machos e fêmeas, de padrão sanitário convencional (Institute of Laboratory Animal Resources, 1996) provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e do Biotério do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Animais da Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal de Mato Grosso do Sul (IAGRO), localizados em Campo Grande, MS. Aos animais foram fornecidos: fotoperíodo de doze horas de claro e doze horas de escuro; alojamento em gaiolas de plástico de acordo com as recomendações internacionais de densidade populacional (Institute of Laboratory Animal Resources, 1996); ração comercial Nuvilab CR-1® (Nuvital, Curitiba, PR, **Brasil**); água *ad libitum*, cama de maravalha de *Pinnus* sp. peneirada. As condições de climatização existentes no Biotério Central da Universidade, com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $60\% \pm 10\%$ e as condições de climatização do Biotério da IAGRO, por meio de ar-condicionado central com controle de temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Os animais avaliados foram:

- a) camundongos – linhagem *outbred* ou heterogênica – Swiss: cinco machos e seis fêmeas de cinco dias de idade; oito machos e sete fêmeas de 21 dias de idade, provenientes do Biotério da IAGRO;
- b) camundongos – linhagem híbrida (BALB/c x C57BL/6)F1: resultantes de cruzamentos de linhagens *inbred* ou isogênicas de fêmeas BALB/c com machos C57BL/6: sete machos e oito fêmeas de cinco dias de idade; oito machos e oito fêmeas 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFMS.

2.2 *Tratamentos*

Foram 16 tratamentos agrupados em quatro fatores com dois níveis em cada um:

- a) fator linhagem: linhagem *outbred* ou heterogênic – Swiss e linhagem híbrida F1 (BALB/c x C57BL/6)F1;
- b) fator sexo: machos e fêmeas;
- c) fator idade: cinco dias de idade e 21 dias de idade;
- d) fator material: cérebro de bovinos eutanasiados e de cérebro de bovinos que vieram a óbito.

Os tratamentos foram organizados em um esquema fatorial 2x2x2x2.

2.3 *Fator material*

Foram dois os fatores materiais utilizados:

- a) fator material 1: *pool* de três cérebros positivos no teste de imunofluorescência direta para raiva, coletados de bovinos eutanasiados;
- b) fator material 2: *pool* de três cérebros positivos no teste de imunofluorescência direta para raiva, coletados de bovinos que vieram a óbito pela enfermidade.

Para o fator material 1 foram utilizados treze camundongos *outbred* e dezesseis camundongos Híbridos F1, distribuídos em grupos de dois machos e três fêmeas com cinco dias de idade e quatro machos e quatro fêmeas com 21 dias de idade da linhagem Swiss. E grupos de quatro machos e quatro fêmeas com cinco dias de idade e quatro machos e quatro fêmeas com 21 dias de idade da linhagem (BALB/c x C57BL/6)F1.

Para o fator material 2 foram utilizados treze camundongos *outbred* e quinze camundongos híbridos F1, distribuídos em grupos de três machos e três fêmeas com cinco dias de idade e quatro machos e três fêmeas com 21 dias de idade da linhagem Swiss. E grupos de três machos e quatro fêmeas com cinco dias de idade e quatro machos e quatro fêmeas com 21 dias de idade da linhagem (BALB/c x C57BL/6)F1.

A metodologia descrita nos subitens 2.1, 2.2 e 2.3 está sumarizada na Figura 1.

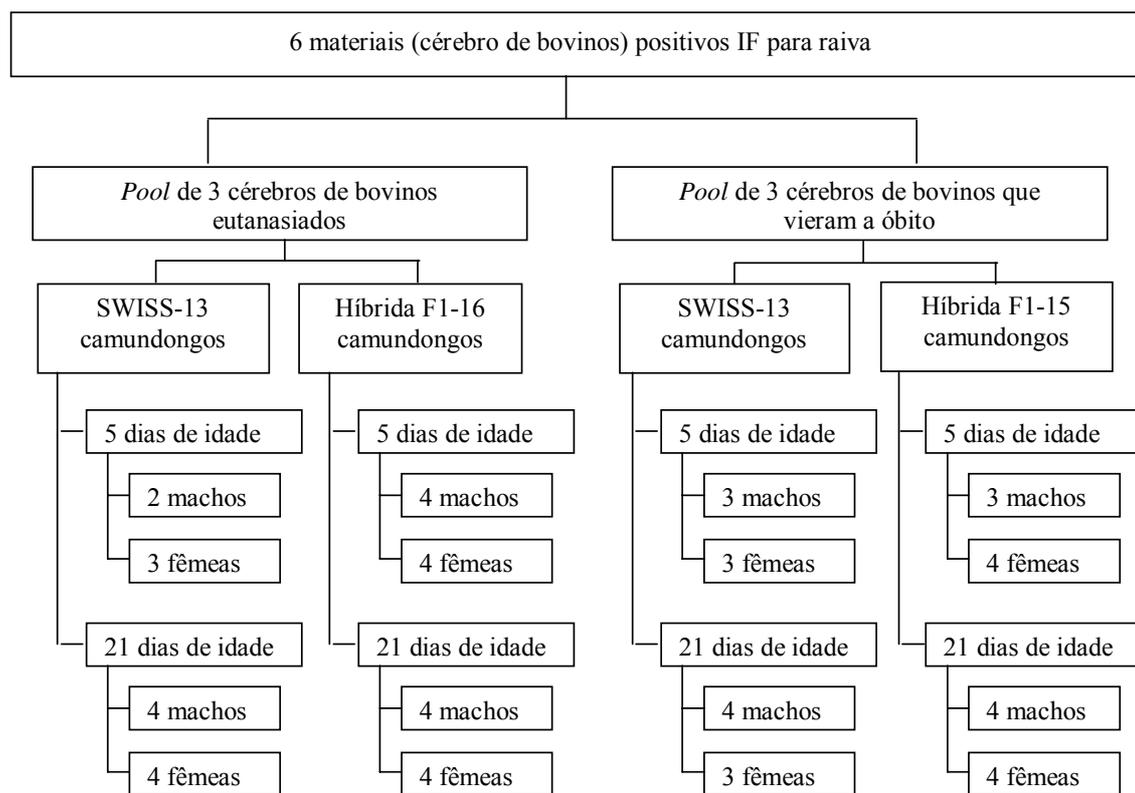


Figura 1- Distribuição dos tratamentos nos camundongos híbridos e swiss, segundo a amostra e a idade dos camundongos.

Dos 64 camundongos planejados para compor a amostra foi possível utilizar apenas 63 animais. O isolamento do vírus da raiva pela técnica de imunofluorescência direta, a partir das amostras dos 63 camundongos inoculados que vieram a óbito, foi possível em 57 animais. Dos seis camundongos Swiss dos quais não foi isolado o vírus, três morreram três dias após a inoculação por morte inespecífica e três, que já apresentavam sintomas, foram canibalizados pela mãe

2.4 Ambiente

Os camundongos foram inoculados e mantidos em sala da ala de infectório no laboratório da IAGRO, à temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.5 *Material biológico*

Os materiais biológicos foram provenientes de cérebros de bovinos enviados ao Laboratório da IAGRO para análise e que se apresentaram positivos na prova de imunofluorescência. “Escolhidos” três materiais de bovinos que foram eutanasiados, reunidos em forma de um *pool* (fator material 1) e três materiais de bovinos que foram a óbito pela enfermidade e também reunidos em um *pool* (fator material 2).

2.6 *Preparo do material biológico*

2.6.1 *Para o teste biológico*

Realizado segundo Koprowski (1976), o material encefálico de três bovinos eutanasiados foi homogeneizado, retirado um grama, macerado em gral estéril e adicionados 4 mililitros (ml) de solução fisiológica.

Foi realizado o mesmo procedimento para os três cérebros de bovinos que vieram a óbito pela enfermidade.

Os materiais resultantes foram mantidos sob refrigeração (2°C a 8°C), para inocular em camundongos, no mesmo dia, por via intracerebral.

2.6.2 *Para o teste de imunofluorescência*

Com as partes colhidas do cérebro dos camundongos, foi feita a impressão em lâmina de microscópio suavemente. Essas impressões, delimitadas por campos marcados na lâmina, foram secas por 30 minutos à temperatura ambiente e fixadas em acetona, mantendo-as incubadas por duas a quatro horas a -20°C. As lâminas foram secas novamente à temperatura ambiente (Tierkel, 1976).

2.7 *Testes*

2.7.1 *Teste biológico- Inoculação intracerebral em camundongos (IIC)*

Foram realizadas inoculação intracerebral em camundongos, com 0,01 ml por

animal, nos camundongos de cinco dias de idade e 0,02 ml por animal em camundongos com 21 dias, segundo técnica preconizada por Koprowski (1976).

Foram inoculados 57 camundongos, destes 26 camundongos Swiss e 31 híbridos (BALB/c x C57BL/6)F1.

Os 26 camundongos Swiss foram divididos em: tratamento 1, cinco camundongos (dois machos e três fêmeas) com cinco dias de idade e oito (quatro machos e quatro fêmeas) com 21 dias de idade; e tratamento 2, seis camundongos (três machos e três fêmeas) com cinco dias de idade e sete camundongos (quatro machos e três fêmeas) com 21 dias de idade.

Os 31 camundongos híbridos (BALB/c x C57BL/6)F1 foram divididos em: tratamento 1, oito camundongos (quatro machos e quatro fêmeas) com cinco dias de idade e oito camundongos (quatro machos e quatro fêmeas) com 21 dias de idade; e tratamento 2, em sete camundongos (três machos e quatro fêmeas) com cinco dias de idade e oito camundongos (quatro machos e quatro fêmeas) com 21 dias de idade.

Os camundongos foram observados até sua morte e logo após, foi colhido o cérebro de cada um e realizada o teste de imunofluorescência direta para raiva.

2.7.2 *Teste de imunofluorescência (IF)*

As lâminas contendo impressões do material encefálico dos camundongos foram cobertas com conjugado anti-rábico fluorescente e examinadas em microscópio de fluorescência, em aumento de 100 vezes, segundo a técnica descrita por Dean e Abelseth (1976). A prova foi realizada no laboratório da IAGRO.

2.8 *Análise estatística*

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado com os tratamentos no esquema fatorial (2×2×2×2) com diferente número de repetições, empregando-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + L_j + S_k + I_l + (TxL)_{ij} + (TxS)_{ik} + (TxI)_{il} + (LxS)_{jk} + (LxI)_{jl} + (SxI)_{kl} + (TxLxS)_{ijk} + (TxLxI)_{ijl} + (TxSxI)_{ikl} + (LxSxI)_{jkl} + (TxLxSxI)_{ijkl} + \varepsilon_{ijklm}$$

onde:

Y_{ijklm} = nº de dias da inoculação até o óbito do i ésimo material, j ésima linhagem, k ésimo sexo e l ésima idade na m ésimo camundongo;

μ = média geral;

T_i = efeito do i ésimo material;

L_j = efeito da j ésima linhagem;

S_k = efeito do k ésimo sexo;

I_l =efeito do l ésima idade;

ε_{ijklm} = erro aleatório.

Para a identificação de diferenças estatísticas empregou-se a análise de variância e o teste F de Fischer com um nível de 5% de significância.

3. Resultados

A análise estatística demonstrou haver interação significativa entre as variáveis: idade e material ($p = 0,0016$) e entre linhagem, sexo e material ($p = 0,0164$).

Os valores obtidos do período de ocorrência (dias) da morte dos animais das linhagens de camundongos (BALB/c x C57BL/6)F1 híbrida e Swiss (convencional) de machos e fêmeas, inoculados com material de cérebros de bovinos eutanasiados e dos que vieram a óbito pela enfermidade, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Foi observada diferença significativa entre as duas linhagens apenas nos camundongos fêmeas inoculados com material de cérebros de bovinos eutanasiados (Tabela 1).

Observou-se também que houve diferença significativa entre machos e fêmeas apenas nos camundongos da linhagem Swiss inoculados com material de cérebros de bovinos eutanasiados (Tabela 1).

Os percentuais de mortalidade em três intervalos de dias após a inoculação, obtidos nos machos e nas fêmeas e nas duas linhagens estudadas estão apresentados na Tabela 3. Observa-se uma maior concentração de mortalidade do 9º ao 14º dia após a inoculação.

Tabela 1

Valores (média \pm desvio-padrão) do período de ocorrência (dias) da morte de camundongos da linhagem híbrida F1 (BALB/c x C57BL/6)F1 e da linhagem Swiss, fêmeas e machos, inoculados com material de cérebros positivos para raiva provenientes de bovinos eutanasiados

Linhagens	Fêmeas	Machos	Valor- p
Híbrida F1	11,50 ^{a,A} \pm 0,926 n = 8	12,50 ^{a,A} \pm 1,069 n = 8	p = 0,2229
Swiss	15,71 ^{b,B} \pm 2,563 n = 7	12,67 ^{a,A} \pm 2,503 n = 6	p = 0,0017
Valor-p	p < 0,0001	p = 0,8906	

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa (p < 0,05) pelo teste F de Fisher na ANAVA.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa (p < 0,05) pelo teste F de Fisher na ANAVA.

Tabela 2

Valores (média \pm desvio-padrão) do período de ocorrência (dias) da morte de camundongos da linhagem híbrida F1 (BALB/c x C57BL/6)F1 e da linhagem Swiss, fêmeas e machos inoculados com material de cérebros positivos para raiva provenientes de bovinos que vieram a óbito pela enfermidade

Linhagens	Fêmeas	Machos	Valor-p
Híbrida F1	10,13 ^{a,A} \pm 1,356 n = 8	9,57 ^{a,A} \pm 1,813 n = 7	p = 0,5887
Swiss	9,67 ^{a,A} \pm 1,033 n = 6	9,29 ^{a,A} \pm 2,138 n = 7	p = 0,7485
Valor-p	p = 0,6023	p = 0,7400	

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa (p < 0,05) pelo teste F de Fisher na ANAVA. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa (p < 0,05) pelo teste F de Fisher na ANAVA.

Tabela 3

Percentual de mortalidade das linhagens de camundongos híbridos F1 (BALB/c x C57BL/6)F1 e Swiss, e percentual de mortalidade por sexo de camundongos, inoculados com materiais positivos para raiva por intervalo de dias após inoculação

Intervalos (dias)	Linhagens		Sexo	
	Híbrida F1	Swiss	Fêmeas	Machos
6 – 8	3,2	7,7	-	10,7
9 – 14	96,8	69,2	82,8	85,7
15 – 19	-	23,1	17,2	3,6

Os valores obtidos do período de ocorrência (dias) da morte dos camundongos nas faixas etárias de 5 e 21 dias de idade, inoculados com material de cérebros de bovinos eutanasiados e de bovinos que vieram a óbito pela enfermidade estão apresentados na Tabela 4.

Foi observada diferença significativa entre as duas idades em camundongos de cinco dias inoculados com material de cérebros de bovinos eutanasiados e em camundongos de 21 dias de idade inoculados com material de cérebros de bovinos que vieram a óbito pela enfermidade (Tabela 4).

Os valores obtidos do período de ocorrência (dias) da morte dos camundongos inoculados com material de cérebros de bovinos eutanasiados e de bovinos que vieram a óbito pela enfermidade, da linhagem de camundongos híbridos (BALB/c x C57BL/6)F1 e Swiss, machos e fêmeas de 5 e 21 dias de idade, estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Foi observada diferença significativa entre os dois materiais de inoculação na linhagem híbrida (BALB/c x C57BL/6)F1 apenas em camundongos machos de 21 dias de idade, inoculados com materiais de cérebros de bovinos que vieram a óbito pela enfermidade (Tabela 5).

Não foi observada diferença significativa entre os dois materiais de inoculação, cérebros de bovinos eutanasiados e que vieram a óbito pela enfermidade, apenas em camundongos machos de cinco dias de idade na linhagem Swiss (Tabela 6).

Os percentuais de mortalidade em três intervalos do período de ocorrência obtido nos camundongos de cinco e 21 dias de idade e nos dois materiais de inoculação estudados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 4

Valores (média \pm desvio-padrão) do período de ocorrência (dias) da morte de camundongos com idades de 5 e 21 dias, inoculados com material de cérebros positivos para raiva provenientes de bovinos eutanasiados e de bovinos que vieram a óbito pela enfermidade

Idade	Cérebro de bovinos eutanasiados	Cérebro de bovinos que vieram a óbito pela enfermidade
5 dias	12,2 ^a \pm 1,363 N = 13	10,5 ^b \pm 2,025 n = 13
21 dias	13,7 ^b \pm 2,822 N = 16	8,9 ^a \pm 0,258 n = 15
Valor-p	p = 0,0249	p = 0,0166

Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste F de Fisher na ANAVA.

Tabela 5

Valores (média \pm desvio-padrão) do período de ocorrência (dias) da morte de camundongos inoculados com material positivo para raiva proveniente de cérebros de bovinos eutanasiados e de bovinos que vieram a óbito pela enfermidade, na linhagem híbrida (BALB/c x C57BL/6)F1, fêmeas e machos de 5 e 21 dias de idade

Material de cérebro de bovinos	5 dias		21 dias	
	5 dias	21 dias	5 dias	21 dias
Eutanasiados	11,75 ^a \pm 0,500 n = 4	11,25 ^a \pm 1,258 n = 4	11,75 ^a \pm 0,500 n = 4	13,3 ^b \pm 0,957 n = 4
Que vieram a óbito pela enfermidade	11,25 ^a \pm 0,957 n = 4	9,00 ^a \pm 0,000 n = 4	10,33 ^a \pm 2,887 n = 3	09,00 ^a \pm 0,000 n = 4
Valor-p	p = 0,6640	p = 0,0557	p = 0,2577	p = 0,0006

Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste F de Fisher na ANAVA.

Tabela 6

Valores (média \pm desvio-padrão) do período de ocorrência de dias da morte de camundongos inoculados com material positivo para raiva proveniente de cérebros de bovinos eutanasiados e de bovinos que vieram a óbito pela enfermidade na linhagem Swiss, fêmeas e machos, de 5 e 21 dias de idade

Material de cérebros de bovinos	5 dias		21 dias	
	5 dias	21 dias	5 dias	21 dias
Eutanasiados	14,00 ^b \pm 2,000 n = 3	17,00 ^b \pm 2,309 n = 4	11,50 ^a \pm 0,707 n = 2	13,25 ^b \pm 2,986 n = 4
Que vieram a óbito pela enfermidade	10,33 ^a \pm 1,155 n = 3	9,00 ^a \pm 0,000 n = 3	10,00 ^a \pm 3,464 n = 3	8,75 ^a \pm 0,500 n = 4
Valor-p	p = 0,0082	p \leq 0,0001	p = 0,3152	p = 0,0003

Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste F de Fisher na ANAVA.

Tabela 7

Percentual de mortalidade de camundongos por idade e por material de cérebro bovino, inoculados com materiais positivos para raiva, por intervalo de dias após a inoculação

Intervalo (dias)	Idade		Material de cérebro de bovinos	
	5 dias	21 dias	Eutanasiados	Que vieram a óbito pela enfermidade
6 – 8	7,7%	3,2%	-	10,7%
9 – 14	88,5%	80,7%	79,3%	89,3%
15 – 19	3,8%	16,1%	20,7%	-

4. Discussão

Para melhor entendimento, a discussão dos resultados será enfocada de forma sistemática. Inicialmente, abordando-se a interferência da linhagem e sexo, em seguida, da idade dos camundongos e, finalmente, a relevância da origem do material de cérebro bovino de animais eutanasiados (PE) ou que vieram a óbito pela raiva (PM).

A diferença superior da linhagem de camundongos híbridos (BALB/c x C57BL/6)F1 em relação aos heterogênicos (Swiss), observada nas fêmeas inoculadas com material de cérebros de bovinos eutanasiados (Tabela 1), pode ser explicada por uma maior suscetibilidade da linhagem. Essa condição deve-se ao fato de que, ao se utilizarem camundongos híbridos F1, que são animais genéticos e fenotipicamente uniformes,

eliminou-se a variabilidade genética individual (Benavides e Guénet, 2003). A resposta mais uniforme da linhagem híbrida F1 também foi observada no presente trabalho ao se verificar uma maior concentração de mortalidade (96,8%) de nove a catorze dias após a inoculação dos materiais em relação à linhagem Swiss (69,2%) no mesmo período (Tabela 3).

A linhagem híbrida F1 mostrou-se tão eficiente quanto a Swiss nos machos inoculados com material PE e nos machos e fêmeas inoculados com material PM, pois nesses casos não se observou diferença significativa entre as duas linhagens.

Na comparação das médias do período de ocorrência de morte entre os sexos, os camundongos machos e fêmeas de linhagem híbrida F1 comportaram-se de maneira semelhante nos dois materiais inoculados. Comportamento este também verificado tanto em camundongos machos como em fêmeas quando inoculados com material PM na linhagem Swiss. Esses resultados concordam com as observações feitas por Koprowski (1976), que relata não haver diferença de suscetibilidade para o vírus da raiva entre camundongos machos e fêmeas. Essa semelhança entre os sexos, independente do material e da linhagem, também pôde ser observada no percentual de mortalidade de 82,8% nas fêmeas e 85,7% nos machos no intervalo de nove a catorze dias após a inoculação (Tabela 3).

Os camundongos fêmeas da linhagem Swiss inoculados com material PE demoraram mais tempo para morrer quando comparados aos machos da mesma linhagem (Tabela 1). Esse resultado pode ter ocorrido por causa da heterogeneidade genética dos animais dessa linhagem. Embora os camundongos sejam muito estudados e suas características fisiológicas conhecidas, quando utilizam os camundongos não-consangüíneos, como a linhagem Swiss, é difícil avaliar se o resultado obtido na prova foi por causa do material testado ou da resposta individual (Santos, 2002).

Em relação à idade dos camundongos inoculados com PE, que normalmente apresentam uma quantidade menor de vírus, a melhor eficiência observada nos animais com cinco dias de idade pode ser entendido pelo fato de os animais lactentes mais novos serem mais sensíveis ao vírus da raiva. Sensibilidade esta relatada por Côrtes et al. (1979) no trabalho realizado com inoculação intracerebral de saliva de cães com raiva em camundongos de cinco a oito dias de idade (lactentes) e de quatro a seis semanas de idade (adultos), no qual verificou que os lactentes eram mais sensíveis que os adultos.

Também foi relatado por Bourhy et al. (1989) que ao substituir os camundongos adultos por camundongos lactentes, no teste biológico, diminuiu-se o período de incubação da enfermidade que é entre sete e vinte dias para cinco e sete dias. Neste trabalho, em que foram utilizados camundongos lactentes e camundongos recém-desmamados, o período de incubação verificado foi entre seis e doze dias em camundongos com cinco dias de idade e entre oito e treze dias em camundongos com 21 dias de idade.

Ao contrário do observado com a inoculação de PE, os camundongos de 21 dias de idade inoculados com PM apresentaram uma mortalidade média mais precoce na prova biológica que os de cinco dias de idade. Esse resultado, divergente do obtido por Casals (1940) que comprovou em estudo comparativo com a inoculação de camundongos com vírus rábico de sete a nove dias, vinte dias e sessenta dias que os de sete a nove dias se apresentavam mais sensíveis, pode ser explicado pelo maior desenvolvimento do sistema imunológico dos animais com 21 dias de idade que produzem uma quantidade maior de anticorpos em menor tempo em resposta a um material com uma maior concentração de vírus. Essa maior produção de anticorpos pode atacar as células nervosas infectadas pelo vírus da raiva com maior intensidade, levando os animais a óbito mais precocemente.

Ao avaliar a variabilidade do período de ocorrência de óbito dos camundongos observou-se que a maior concentração ocorreu no intervalo de nove a catorze dias após a inoculação dos materiais tanto nos camundongos de cinco dias de idade como nos de 21.

Os camundongos apresentaram sintomatologia clínica a partir do 5º ao 13º dias após inoculação, como sinais de excitação, pêlos eriçados, incoordenação, evoluindo para apatia, paralisia e morte de um a seis dias após o início da sintomatologia (seis a dezenove dias após inoculação). Estes demonstram uma mortalidade mais precoce do que aquela obtida por Gomes (2004), que ao realizar trabalho com 74 amostras provenientes de bovinos, eqüídeos, caprinos, cães, observou que os camundongos inoculados com material de cérebro de bovinos apresentaram um período de incubação de sete a dezesseis dias, com morte de um a oito dias após início dos sintomas.

Em relação aos materiais de inoculação estudados observou-se que o material PM induziu a uma mortalidade mais precoce nos camundongos de 21 dias das duas linhagens avaliadas em relação ao material PE (Tabelas 5 e 6), considerando o valor $p = 0,0557$ como significativo. Esse resultado já era esperado por causa de uma possível menor quantidade de vírus no material PE.

Apesar da literatura recomendar (Germano et al., 1977) que os animais com sintomatologia nervosa sejam observados até a morte, o envio de materiais para o diagnóstico laboratorial de raiva de bovinos eutanasiados também ocorre. Por esse motivo, autores como Mori e Lemos (1998) têm recomendado que ao se proceder à eutanásia de bovinos com sintomatologia nervosa enviem ao laboratório outras partes do sistema nervoso como a medula e de preferência todo o cérebro. O procedimento de se recomendar o envio ao laboratório de outras partes do sistema nervoso é reforçado por observação feita por Bingham e van der Merwe (2002) que realizaram estudo para detectar a região do sistema nervoso central de maior concentração de vírus rábico. Observaram que a distribuição de vírus não é homogênea e que o tronco encefálico é a região de maior detecção do vírus, enquanto que regiões como o cérebro contém uma menor quantidade viral. Esse resultado pode sugerir que mesmo animais que foram a óbito pela raiva podem apresentar reações falso-negativas aos testes laboratoriais, dependendo da porção do sistema nervoso enviado para diagnóstico. Apesar das observações relatadas pelos autores, em nosso estudo em que utilizamos apenas cérebro para a realização de pesquisa de vírus rábico, tanto os materiais de bovinos eutanasiados quanto os que vieram a óbito pela enfermidade, apresentaram resultados positivos.

Considerando os camundongos de cinco dias de idade, o material PM induziu a uma mortalidade mais precoce que o material PE apenas nos camundongos fêmeas da linhagem Swiss (Tabelas 5 e 6). O fato de os dois materiais não terem causado uma resposta diferente nos animais com cinco dias de idade pode ser explicado pela imaturidade do sistema imunológico desses animais que não respondem de forma eficiente a uma maior concentração de vírus no material.

O melhor resultado observado para o material PM, independente do sexo, da idade e da linhagem, também pôde ser constatado ao se verificar o percentual de mortalidade de 100% para o PM e 79,3% para o PE nos intervalos de seis a oito dias e de nove a catorze dias após a inoculação (Tabela 7).

5. Conclusões

Nas condições em que foi realizado o presente trabalho, os resultados permitiram-nos concluir que:

As fêmeas de camundongos da linhagem híbrida (BALB/c x C57BL/6)F1 devem ser escolhidas como modelo experimental em substituição às fêmeas de camundongos da linhagem Swiss para o diagnóstico mais precoce do teste biológico, quando o material de inoculação for cérebro de bovinos eutanasiados; não há preferência entre a linhagem de camundongos híbridos (BALB/c x C57BL/6)F1 e a de camundongos Swiss para o diagnóstico nos machos, quando o material de cérebros bovinos positivos para raiva for proveniente de bovinos eutanasiados, e, nos camundongos machos e fêmeas, quando o material for proveniente de bovinos que vierem a óbito pela enfermidade.

Para o resultado mais precoce do teste biológico, independente da linhagem ou do sexo, podem-se indicar camundongos de cinco dias de idade quando o material de inoculação for cérebro de bovinos eutanasiados, e camundongos de 21 dias de idade quando o material de inoculação for cérebro de bovinos que vierem a óbito pela enfermidade.

O material proveniente de bovinos que vierem a óbito pela enfermidade deve ser preferido em relação ao material de bovinos eutanasiados para inoculação em camundongos de 21 dias de idade de ambos os sexos e linhagens e em camundongos fêmeas de cinco dias de idade da linhagem Swiss, e não há preferência de material de cérebros de bovinos eutanasiados ou de bovinos que vierem a óbito pela enfermidade quando inoculados em camundongos de cinco dias de idade de ambos os sexos da linhagem F1 ou em camundongos machos de cinco dias de idade da linhagem Swiss.

O material de inoculação proveniente de bovinos eutanasiados ou que vierem a óbito pela enfermidade influencia na escolha do melhor modelo animal a ser indicado para o teste biológico.

A indicação da linhagem híbrida (BALB/c x C57BL/6)F1 não traz resultados inferiores à linhagem Swiss no teste biológico com material de bovinos positivos para raiva.

Agradecimentos

À Doutora Sílvia Massironi, da Universidade de São Paulo, e ao Médico-Veterinário Ademar Etiro Mori, da Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal, pelo apoio ao desenvolvimento da pesquisa.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, pelo apoio financeiro.

Referências

- Albas, A., Ferrari, C.I.L., Silva, L.H.Q., Bernardi, F., Ito, F.H., 1999. Influence of canine brain decomposition on laboratory diagnosis of rabies. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32 (1), 19-22.
- Baer, G.M., 1975. Bovine paralytic rabies and rabies in the vampire bat. In: Baer, G.M., *The natural history of rabies*. Academic Press, New York, p. 1, pp. 155-175, pp. 387-454.
- Benavides, F.J., Guénet, J.L., 2003. *Manual de genética de roedores de laboratório: principios básicos y aplicaciones*. Ed. Universidad de Alcalá, Madrid, Espana.
- Bier, O., 1990. *Microbiologia e imunologia*. 30ª ed. Melhoramentos, São Paulo.
- Bingham, J., van der Merwe, M., 2002. Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *J. Virol. Methods.* 101, 85-94.
- Bourhy, H., Rollin, P.E., Vicent, J., Sureau, P., 1989. Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. *J. Clin. Microbiol.* 27, 519-523.
- Casals, J., 1940. Influence of age factories on susceptibility of mice to rabies virus. *J. Exp. Med.* 72, 445-51.
- Côrtes, V.A., Côrtes, J.A., Vasconcellos, S.A., Ito, F.H., Rozas, C.E., Nilsson, M.R. et al., 1979. Comparative study of the susceptibility of suckling and adult mice used for the isolation of rabies virus from the saliva of dogs with natural rabies. *Arq. Inst. Biol. (São Paulo)* 46 (3-4), 97-101.
- Dean, D.J., Abelseth, M.K., 1976. Prueba de los anticuerpos fluorescentes. In: Kaplan, M.M., Koprowski, H., *La rabia técnicas de laboratorio*. 4ª ed. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, pp. 88-97.

- Germano, P.M.L., Miguel, O., Chamelet, E.L.B., Morita, L.T.M.S., 1977. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 14 (1), 133-141.
- Gomes, A.A.B., 2004. Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil. Tese, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council, 1996. Guide for care and use of laboratory animals. National Academic Press, Washington.
- Kaplan, M.M. 1976. Evaluation de las tecnicas de laboratorios aplicables al diagnostico y la prevencion de la rabia y a las investigaciones antirrabicas. In: Kaplan, M.M., Koprowski, H., La rabia técnicas de laboratorio. 4ª ed. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, pp. 19-26.
- Koprowski, H., 1976. Prueba de inoculación al raton. In: Kaplan, M.M., Koprowski, H., La rabia técnicas de laboratorio. 4ª ed. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, pp. 88-97.
- Mori, A. E., Lemos, R.A.A., 1998. Raiva. In: Lemos, R.A.A. (Org.), Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul: reconhecimento e diagnóstico. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, pp. 47-58.
- Nilsson, M.R., Sugay, W., 1966a. Diagnóstico da raiva: comparação entre a pesquisa de inclusões em esfregaços e a inoculação de camundongos. *Arq. Inst. Biol. (São Paulo)* (33), 11-16.
- Nilsson, M.R., Sugay, W., 1966b. O uso de camundongos lactentes no diagnóstico da raiva. *Arq. Inst. Biol. (São Paulo)* (33), 47-48.
- Peixoto, Z.M.P., Cunha, E.M.S., Sacramento, D.R.V., Souza, M.C.A.M., Silva, L.H.Q., Germano, P.M.L. et al., 2000. Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. *Braz. J. Microbiol.* 31 (1), 34-36.
- Santos, B.F., 2002. Classificação dos animais de laboratório quanto ao status genético. In: Andrade, A., Pinto, S.C., Oliveira, R.S. (Org.), Animais de laboratório: criação e experimentação. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 65-70.
- Tierkel, E.S., 1976. Investigacion microscopica rapida de corpusculos de Negri y preparacion de muestras para las pruebas biológicas. In: Kaplan, M.M., Koprowski, H., La rabia técnicas de laboratorio. 4ª ed. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, pp. 42-53.
- Webster, L.T., Dawson, J.R., 1935. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation: measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 32, 570-573.
- World Health Organization. 2004. WHO Expert Consultation on Rabies. Geneva.

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](#)