

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO DE RAIVA EM
HERBÍVOROS

PEDRO MIGUEL OCAMPOS PEDROSO

PORTO ALEGRE
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO DE RAIVA EM
HERBÍVOROS

PEDRO MIGUEL OCAMPOS PEDROSO

Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias na área de
concentração em Cirurgia, Morfologia
e Patologia animal, da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.
Orientador: Sérgio Ceroni da Silva
Co-Orientador: David Driemeier

PORTO ALEGRE
2008

Pedro Miguel Ocampos Pedroso

Diagnóstico Histológico e Imunoistoquímico de raiva em Herbívoros.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2008.

Prof. Dr. Sérgio Ceroni da Silva

Orientador

Prof. Dr. David Driemeier

Co-Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Claudio Severo Lombardo de Barros (UFSM)

Membro da Comissão

Prof. Dr. Aldo Gava (UDESC)

Membro da Comissão

Dra Ana Lucia Schild (UFPEL)

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela vida, saúde e proteção.

Aos meus pais Ângelo Miguel Ribeiro Pedroso e Maria Suzana Ocampos Pedroso que sempre estiveram ao meu lado apoiando-me em todas as situações e passando importantíssimas lições de vida e ao meu mano Ricardo pela amizade e companheirismo.

A minha grande e forte avó Clotildes Pedroso por tudo que me proporcionou nesses últimos anos em Porto Alegre.

Ao Professor David Driemeier pelas oportunidades e conhecimentos adquiridos nesses anos de convivência.

Ao Professor Dr. Sérgio Ceroni pelas oportunidades nessa Universidade.

Aos amigos Pedro Soares Bezerra Júnior e Caroline Argenta Pescador pela valiosa amizade e ajuda na dissertação e trabalhos realizados nesses anos.

Ao amigo e Professor Edson Moleta Colodel da Universidade Federal de Mato Grosso pelas amostras de bovinos e eqüinos com raiva.

Ao amigo Felipe Pierezan da Universidade Federal de Santa Maria pelo livro História Natural da Raiva e outros materiais de ensino.

Aos meus amigos colorados e parceiros de Beira-Rio Paulinho, DJ, Vacaria, Uruguaio, André e Ogro, ou seja, quase todo o Setor de Patologia Veterinária da UFRGS.

Também aos colegas e amigos Mauro, Eduardo, Luluzinha, Nadia, Adriana Santos, Saulo, Adriana Meirelles e demais estagiários e bolsistas do SPV.

Aos funcionários Alexandre Brasil, Ângela Belmonte de Souza e Marília de Oliveira Belmonte pela grande ajuda e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Breve histórico	13
2.2 Etiologia	15
2.3 Epidemiologia	16
2.4 Patogenia	17
2.5 Sinais Clínicos.....	18
2.6 Achados de Necropsia.....	20
2.7 Histopatologia	20
2.8 Diagnóstico e Diagnóstico Diferencial	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Otimização da técnica de imunoistoquímica (IHQ) para raiva.....	25
3.2 Mapeamento das regiões do Sistema Nervoso Central para estudo histoquímico e imunoistoquímico de bovinos e eqüinos com raiva	28
3.3 Análise histopatológica e imunoistoquímica do sistema nervoso de herbívoros acometidos por raiva diagnosticados pelo SPV-UFRGS	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Otimização da técnica de IHQ	32
4.2 Distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos e eqüinos com raiva....	40
4.2.1 Epidemiologia e sinais clínicos de bovinos com raiva	40
4.2.2 Histopatologia de bovinos com raiva.....	40
4.2.3 Epidemiologia e sinais clínicos de eqüinos com raiva	46
4.2.4 Histopatologia de eqüinos com raiva.....	46
4.2.5 Imunoistoquímica no SNC de bovinos com raiva	47
4.2.6 Imunoistoquímica no SNC de eqüinos com raiva	51
4.3 Avaliação histopatológica e imunoistoquímica do SNC de herbívoros acometidos por raiva diagnosticados pelo SPV-UFRGS	53
4.3.1 Epidemiologia e sinais clínicos.....	53
4.3.2 Histopatologia de herbívoros com raiva	54
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Cortes seriados do SNC de bovino. Vista dorsal. 1: medula espinhal; 2: óbex; 3: pedúnculo cerebelar rostral; 4: pedúnculo cerebelar caudal; 5: pedúnculo cerebelar medial; 6: colículo caudal; 7: colículo rostral e 8: tálamo. 29
- Figura 2 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Cortes seriados do SNC de bovino. 9: cerebelo; 10: telencéfalo frontal; 11: telencéfalo parietal; 12: telencéfalo temporal; 13: telencéfalo occipital. 29
- Figura 3 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Cortes utilizados para o estudo histológico e imunoistoquímico de bovinos e eqüinos com raiva. 1: medula espinhal; 2: secção do bulbo na altura do óbex; 3: pedúnculo cerebelar rostral; 4: pedúnculo cerebelar caudal; 5: pedúnculo cerebelar medial; 6: colículo caudal; 7: colículo rostral; 8: tálamo; 9: cerebelo; 10: telencéfalo frontal; 11: telencéfalo parietal; 12: telencéfalo temporal; 13: telencéfalo occipital; 14: hipocampo e 15: gânglio trigêmeo. 30
- Figura 4 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Medula espinhal. Marcação acentuada de coloração vermelha em neurônios. Recuperação antigênica com calor e tampão citrato. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 10. 34
- Figura 5 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Cerebelo. Presença de marcação de coloração vermelha em corpúsculos de inclusão viral no pericário (seta maior) e axônio (seta menor) de célula de Purkinje. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 20. 34
- Figura 6 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Medula espinhal. Recuperação antigênica com protease XIV. Observa-se leve marcação em neurônio. Anticorpo monoclonal GeneTex (GTX 21002) 1:500. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 40. 36
- Figura 7 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Tálamo. Recuperação antigênica com proteinase K. Observa-se marcação leve em neurônios. Anticorpo monoclonal GeneTex (GTX 21002) 1:500. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 40. 36
- Figura 8 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Medula espinhal. Recuperação antigênica com proteinase K. Observa-se marcação leve em neurônio. Anticorpo monoclonal Bidesign (C86307M) 1:500. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 40. 37
- Figura 9 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Medula espinhal. Marcação acentuada de agregado de grânulos em neurônios corados em vermelho. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 40. 38
- Figura 10 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Medula espinhal. Presença de corpúsculo de inclusão viral único em neurônio fortemente marcado. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 40. 39
- Figura 11 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Marcação acentuada de antígeno viral da raiva em neurônio. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 40. 39

Figura 12 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Pedúnculo cerebelar rostral. Presença de manguito perivascular focal moderado. Coloração de HE, Obj. 20.	41
Figura 13 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Gânglio trigêmeo. Presença de neurônio necrótico (seta) e com infiltrado inflamatório mononuclear. Coloração de HE, Obj. 40.....	42
Figura 14 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Gânglio trigêmeo. Presença de micróglia ativada ao redor de neurônio (seta). Coloração de HE, Obj. 40.	42
Figura 15 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Gânglio trigêmeo. Presença de neuronofagia. Coloração de HE, Obj. 40.	43
Figura 16 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Gânglio trigêmeo. Presença de vacúolos em neurônio. Coloração de HE, Obj. 100.....	43
Figura 17 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Cerebelo. Presença de corpúsculos de Negri em célula de Purkinje. Coloração de HE, Obj. 40.	44
Figura 18 - Cortes utilizados para o estudo histológico e imunoistoquímico de bovinos e eqüinos com raiva. Cortes seriados de cérebro bovino. 1: medula espinhal; 2: secção do bulbo na altura do óbex; 3: pedúnculo cerebelar rostral; 4: pedúnculo cerebelar caudal; 5: pedúnculo cerebelar medial; 6: colículo caudal; 7: colículo rostral; 8: tálamo; 9: cerebelo; 10: telencéfalo frontal; 11: telencéfalo parietal; 12: telencéfalo temporal; 13: telencéfalo occipital. Os pontos vermelhos representam a intensidade de marcação imunoistoquímica em cada corte histológico.....	49
Figura 19 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Gânglio trigêmeo. Marcação positiva em neurônio íntegro (seta). Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 20.....	50
Figura 20 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Gânglio trigêmeo. Ao centro marcação positiva em neurônio degenerado (seta). Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 20.....	50
Figura 21 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Marcação positiva em neurônio em neuronofagia (seta). Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 40.....	51
Figura 22 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Gânglio trigêmeo. Neurônio vacuolizado apresentando marcação positiva em vermelho (seta). Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 20.....	51
Figura 23 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Eqüino 3. Medula espinhal. Marcação positiva leve em neurônio (seta). Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 20.....	52
Figura 24 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Cerebelo. Presença de corpúsculo de inclusão viral em célula de Purkinje (seta). Coloração de HE, Obj. 40.	54
Figura 25 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Grande quantidade de neurônios fortemente marcados. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 4.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais eventos relacionados ao estudo e diagnóstico da raiva.....	14
Tabela 2 - Achados clínicos, patológicos, e de imunofluorescência direta de materiais provenientes de cinco bovinos com suspeita de raiva encaminhados ao Setor de Patologia Veterinária UFRGS.....	33
Tabela 3 - Resultados imunoistoquímicos obtidos com a utilização do anticorpo policlonal (Chemicon #5199) utilizando três recuperações antigênicas.....	35
Tabela 4 - Resultados imunoistoquímicos obtidos com a utilização do anticorpo monoclonal (GTX 21002) utilizando três recuperações antigênicas.....	37
Tabela 5 - Resultados imunoistoquímicos obtidos com a utilização do anticorpo monoclonal Biodesign (C86307M) utilizando três recuperações antigênicas.....	38
Tabela 6 - Localização e intensidade das lesões histológicas em bovinos com raiva.....	45
Tabela 7 - Localização e intensidade das lesões histológicas em eqüinos com raiva.....	47
Tabela 8 - Localização e intensidade de marcação imunoistoquímica em bovinos com raiva.....	48
Tabela 9 - Localização e intensidade de marcação imunoistoquímica em eqüinos com raiva.....	52

RESUMO

O presente trabalho foi dividido em três etapas: 1) otimização da técnica de imunistoquímica para raiva utilizando três diferentes anticorpos; 2) mapeamento histológico e imunistoquímico de cortes seriados do sistema nervoso central (SNC) de bovinos e eqüinos e 3) Histologia e imunistoquímica de bovinos com diagnóstico de raiva registrados no programa DXSNC do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com lesões de encefalite não-supurativa e de casos de eqüinos com raiva do arquivo do Setor de Patologia da UFRGS entre 2002-2007. Para a otimização da técnica de imunistoquímica para raiva foram utilizadas 5 amostras de SNC de bovinos infectados naturalmente com o vírus da raiva usando-se um anticorpo policlonal e dois monoclonais. Para a recuperação antigênica foram avaliados os seguintes reagentes: protease XIV, proteinase K e tampão citrato pH 6,0. A detecção de antígeno rábico nas amostras foi possível com os três anticorpos utilizados. O anticorpo policlonal foi superior aos anticorpos monoclonais, demonstrando bons resultados com os três protocolos de recuperação antigênica, obtendo uma maior intensidade de marcação quando utilizado o tampão citrato. No mapeamento do SNC foram avaliadas 12 amostras de bovinos e 3 de eqüinos que morreram de raiva. Foi realizado histologia convencional e imunistoquímica com utilização do anticorpo policlonal na diluição de 1:1000. Os principais achados histopatológicos em bovinos e eqüinos caracterizaram-se por meningoencefalite não-supurativa, microgliose focal, degeneração e necrose neuronal e neuronofagia. Em bovinos os principais locais de lesões foram no tronco encefálico, medula espinhal e gânglio trigêmeo. Corpúsculos de inclusão foram observados em 83,33% dos bovinos e em 100% dos eqüinos. Na imunistoquímica todos os casos de bovinos e eqüinos obtiveram marcação positiva para raiva. Na terceira etapa do trabalho a histopatologia e imunistoquímica de 30 amostras de bovinos com raiva do Programa DXSNC do SPV-UFRGS caracterizaram-se por meningoencefalite e meningomielite não supurativa com infiltrado mononuclear perivascular, principalmente de linfócitos e também de plasmócitos e macrófagos, além de, microgliose, satellitose e neuronofagia. Presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos foi observado em 73,33% dos casos. Na imunistoquímica obteve-se marcação em 80% dos casos. Em dois casos de eqüinos examinados do material de arquivo do SPV-UFRGS havia meningoencefalite não-supurativa e com presença de corpúsculos de inclusão e marcação imunistoquímica nos dois casos.

ABSTRACT

The present study was divided in three stages: 1) optimization of the immunohistochemistry technique for rabies using three different antibodies; 2) histological and immunohistochemical mapping of serial sections of the central nervous system (CNS) of cattle and horses, and 3) histology and immunohistochemistry of bovine diagnosed with rabies registered on the DXSNC program of the Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA) with lesions of non-suppurative encephalitis and of equines diagnosed with rabies registered on the files of Veterinary Pathology Section at UFRGS from 2002 to 2007. For the optimization of the rabies immunohistochemistry technique, 5 samples of CNS of bovine naturally infected with rabies virus were used. One polyclonal antibody and two monoclonal antibodies were used. The following reagents were evaluated for antigen retrieval: XIV protease, proteinase K and citrate buffer (pH 6,0). Detection of rabic antigen was possible with the three antibodies tested. The polyclonal antibody was superior to the monoclonal antibodies, demonstrating good results with the three antigen retrieval protocols. The highest intensity staining was obtained with the citrate buffer. In the CNS mapping, 12 samples of bovine and 3 of equine that died of rabies were evaluated. Conventional histology and immunohistochemistry with polyclonal antibody in a 1:1000 dilution were performed. The main histopathological findings in cattle and horses were non-suppurative purulent meningoencephalitis, focal microgliosis, neuronal degeneration and necrosis and neurophagia. In bovine, the major sites of lesions were brain stem, spinal cord and trigeminal ganglion. Inclusion bodies were observed in 83.33% of bovine and 100% of equine. In the immunohistochemistry, all the bovine and equine cases resulted in positive staining for rabies. On the third stage of the study, histopathology and immunohistochemistry of 30 samples of bovine diagnosed with rabies from the DXSNC program of SPV-UFRGS were characterized by meningoencephalitis and non-suppurative meningomyelitis with perivascular mononuclear infiltrate, especially with lymphocytes and also plasma cells and macrophages. Microgliosis, satellitosis and neuronophagia were also seen. Intracytoplasmic inclusion bodies were observed in 73.33% of the cases. Positive staining was obtained in 80% of the cases in the immunohistochemistry. In two equine cases examined from the SPV-UFRGS file material, there was non-suppurative meningoencephalitis with inclusion bodies and immunohistochemical positive staining.

1. INTRODUÇÃO

A raiva é uma zoonose (SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995; WOLDEHIWET, 2002), causada pelo vírus da raiva, do gênero *Lyssavirus* e família *Rhabdoviridae* (RADOSTITS *et al.*, 2002), distribuída em quase todo o mundo. Afeta animais domésticos e silvestres (SWANEPOEL, 2004), sendo transmitida a partir da inoculação do vírus contido na saliva através da mordedura (SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995). A raiva é uma doença endêmica em muitas regiões do mundo, causando uma mortalidade mundial estimada em 40.000 a 100.000 humanos por ano (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Na América do Sul a raiva em bovinos é transmitida por morcegos hematófagos, principalmente o *Desmodus rotundus* resultando em um grande problema econômico e de saúde pública (MARTÍNEZ-BURNES *et al.*, 1997; RADOSTITS *et al.*, 2002).

O suporte laboratorial é imprescindível para o diagnóstico da doença, sendo a técnica de imunofluorescência direta (IFD) em tecidos refrigerados ou congelados o teste padrão utilizado devido a sua rapidez e acurácia (ZIMMER *et al.*, 1990). Outro teste utilizado e a inoculação intracerebral em camundongos que apesar de ser mais específica, tem a desvantagem de ser demorada quando comparada a IFD (GERMANO *et al.*, 1977).

Nas últimas décadas, com os avanços, da biologia molecular e da imunologia, novas técnicas mais sensíveis e específicas foram desenvolvidas para a realização do diagnóstico de raiva. (GERMANO, 1994). Dentro das técnicas imunológicas, o teste de imunoistoquímica vem se destacando dentro dos laboratórios de patologia pela facilidade da utilização de amostras já previamente fixadas em formol, diminuindo assim o risco de alterações autolíticas comprometerem o diagnóstico (RADOSTITS *et al.*, 2002; ARSLAN; SAGLAM; TEMUR, 2004).

Este trabalho foi elaborado em três etapas. A primeira parte teve o objetivo de otimizar a técnica de imunoistoquímica para raiva a partir da utilização de três anticorpos, dois monoclonais e um policlonal para implantar como método de diagnóstico de rotina no Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A segunda etapa foi realizar o estudo histopatológico e imunoistoquímico para estabelecer as áreas de maior ocorrência de corpúsculos de inclusões e intensidade de marcação do antígeno viral, respectivamente. A última etapa

foi realizar a histologia e imunoistoquímica de casos de raiva de amostras de bovinos registrados no programa DXSNC do SPV e de eqüinos do arquivo do SPV entre 2002-2007. Com base nestas etapas o estudo teve por objetivos implantar a imunoistoquímica como ferramenta de diagnóstico de raiva para bovinos e eqüinos do SPV-UFRGS; determinar os principais locais de presença de lesões e corpúsculos de inclusão pela histoquímica, comparando com a intensidade de marcação pela imunoistoquímica; e auxiliar no diagnóstico para o programa de vigilância epidemiológica da Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) coordenada pelo Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e outras encefalopatias (PNCRH) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Breve histórico

A raiva tem uma interessante e longa história que se perde na antiguidade. Do grego raiva é chamada de Lyssa ou Lytta, que significa loucura (STEELE; FERNANDEZ, 1991). No século XXIV a.C., no “Código de Eshnunna”, elaborado na Mesopotâmia, consta os primeiros relatos da doença no homem. Neste código estava especificada a quantia que deveria ser paga a família de uma pessoa que morresse em decorrência da mordida de um cachorro que ficasse solto e transmitisse a raiva aos seres humanos (SILVA, 2008).

Louis Pasteur publicou seus primeiros relatos sobre raiva em 1881, num período em que muitos cientistas estavam tentando transmitir a raiva do homem para os animais e dos animais para o homem. Pasteur com sua extraordinária perspicácia e habilidade, a partir dos sintomas e achados histológicos, concluiu que o sistema nervoso central e especialmente o bulbo que une a medula espinhal ao cérebro estavam particularmente ligados ao desenvolvimento da doença (STEELE; FERNANDEZ, 1991). Na tabela 1 estão os principais eventos relacionados ao estudo e diagnóstico da raiva a partir de 1900.

Tabela 1 - Principais eventos relacionados ao estudo e diagnóstico da raiva.

Período	Evento	Referências
1900	Observado inclusões intracitoplasmáticas Filtrabilidade Disseminação neuronal para as glândulas salivares Aprimoramento da preparação de vacina a partir de tecido nervoso	Negri (1903) Remlinger (1903) Bartarelli (1904) Fermi (1908)
1910	Aplicação de técnicas primárias de cultura de tecidos Estabilização da produção de vacina de tecido nervoso Suspeita de raiva em morcegos no Novo Mundo	Noguchi (19013); Levaditi (1913) Semple (1919) Carini (1911)
1920	Aprimoramento da coloração para corpúsculo de Negri	Sellers (1927)
1930	Inoculação em camundongos para diagnóstico e sorologia	Hoyt; Jungeblut (1930); Webster; Dawson (1935)
1940	Cultivo do vírus rábico em embrião de galinha	Bernkopf; Klinger (1940)
1950	Passagem seriada de vírus "fixo" vírus de "rua" em cultura de tecido Cultivo de vírus "fixo" e de "rua" em linhagens celulares tumorais Diagnóstico por imunofluorescência direta	Kissling (1958) Atanasiu; Lepine (1959) Goldwasser; Kissling (1958)
1960	Morfologia definida por microscopia eletrônica Demonstrado que o vírus tem RNA Patogenia melhor esclarecida com modelos animais Teste corneal para diagnóstico antemortem	Almeida <i>et al.</i> (1962); Matsumoto (1962); Atanasiu <i>et al.</i> (1963); Davies <i>et al.</i> (1963) Sokolov; Vanag (1962); Kissling; Reese (1963) Dean <i>et al.</i> (1963); Baer <i>et al.</i> (1965); Schneider (1969) Schneider (1969)
1970	Foram definidas as propriedades antigênicas e estruturais Diagnóstico por peroxidase Infecção via transplante corneal	Schlumberger <i>et al.</i> (1970); Wilkitor <i>et al.</i> (1973); Sokol <i>et al.</i> (1971); Cox <i>et al.</i> (1977); Dietschold <i>et al.</i> (1978) Atanasiu <i>et al.</i> (1971) Houff <i>et al.</i> (1979)
1980	Profilaxia experimental com anticorpos monoclonais Classificação dentro do gênero Lyssavirus	Schumacher <i>et al.</i> (1989) Matthews (1982)
1990	Uso do PCR para diagnóstico	Ermine <i>et al.</i> (1990); Sacramento <i>et al.</i> (1991); McColl <i>et al.</i> (1993); Kamolvarin <i>et al.</i> (1993)

Adaptado de Rupprecht, C. E.; Hanlon, C. A.; Hemachudha, T. Rabies re-examined. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 2, p. 327-343, 2002.

2.2 Etiologia

A raiva é causada por um vírus RNA, envelopado (SWANEPOEL, 2004), da ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus* (CONSALES; BOLZAN, 2007; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007) e é altamente neurotrópico (GEORGE, 1993; WOLDEHIWET, 2002). A família *Rhabdoviridae* é dividida em dois gêneros, *Vesiculovirus*, que inclui o vírus da estomatite vesicular, e *Lyssavirus*, que inclui o vírus da raiva (WOLDEHIWET, 2002). Apresenta 7 genótipos: vírus da raiva (RABV; genótipo 1), vírus do morcego de Lagos (LBV; genótipo 2), vírus de Mokola (MKV; genótipo 3), vírus de Duvenhage (DV; genótipo 4), lissavírus do morcego europeu 1 (EBLV-1; genótipo 5), lissavírus do morcego europeu 2 (EBLV-2; genótipo 6), e lissavírus do morcego australiano (ABLV; genótipo 7) (QUINN *et al.*, 2005; CONSALES; BOLZAN, 2007).

Em seu genoma estão codificadas cinco proteínas, dentre as quais duas funcionam como antígenos principais. A primeira é uma nucleoproteína (antígeno interno e grupo-específico) e a segunda é uma glicoproteína (antígeno de superfície), a qual induz a formação de anticorpos neutralizantes (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). O gene P que produz a fosfoproteína, que é importante não somente pela transcrição e replicação, mas também por interações com componentes da proteína celular durante o transporte axoplasmático. O gene L codifica uma polimerase para a síntese de RNA e o gene M que codifica para uma proteína da matriz (BRADAME; TORDO, 2001 *apud* CONSALES; BOLZAN, 2007; RUPPRECHT, 1992 *apud* CONSALES; BOLZAN, 2007). A partícula do vírus da raiva apresenta o formato de uma bala, medindo 75 nm de diâmetro e 180 nm de comprimento (SWANEPOEL, 2004).

O vírus da raiva em condições naturais é denominado vírus de “rua” (LIEBERMANN, 1999), isolado de animais doentes, e não foi modificado em laboratório. As cepas desse vírus têm um período variável de incubação, que geralmente é longo e retém a capacidade de invadir as glândulas salivares (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Ao contrário, a denominação de vírus “fixo” é dada às cepas adaptadas em animais de laboratório, através de passagens intracerebrais em série (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007), apresentando um período de incubação mais

curto (LIEBERMANN, 1999; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007) e não invadem as glândulas salivares (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

O vírus é destruído em pH baixo e por solventes lipídicos (BARROS *et al.*, 2006), além de temperatura de 80⁰C em 2 minutos e pelos raios ultravioletas em poucos minutos (LIEBERMANN, 1999).

2.3 Epidemiologia

A raiva é uma doença endêmica em muitas regiões do mundo. É estimado que cerca de 40.000 a 100.000 pessoas morrem por ano em decorrência da raiva (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Embora todos os mamíferos sejam susceptíveis ao vírus da raiva, somente canídeos e morcegos são considerados como os vetores mais eficientes da doença (WOLDEHIWET, 2002).

A raiva possui três ciclos: urbano, rural, silvestre e o aéreo. A raiva urbana caracteriza-se pela ocorrência da doença em cães e gatos. O ciclo rural é constituído por herbívoros e o ciclo silvestre inclui animais silvestres como: raposas, guaxinins, gambás e primatas e a transmissão ocorre dentro de uma mesma espécie e entre as diversas espécies. O ciclo aéreo é importante na manutenção do vírus entre as várias espécies de morcegos (hematófagos, frutívoros e insetívoros) que disseminam esse agente etiológico, pois transpõem barreiras geográficas por serem os únicos mamíferos que voam (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). A raiva em bovinos é o maior problema econômico e de saúde pública na América do Sul, onde é transmitida por morcegos hematófagos e resulta em surtos cíclicos. A raiva paralítica bovina é endêmica nas regiões de clima tropical, desde o norte do México ao norte da Argentina (RADOSTITS *et al.*, 2002).

A raiva ocorre em todo território nacional brasileiro e tem importância na maioria dos estados, tanto pelo caráter de zoonose como por causar perdas econômicas na pecuária. Anualmente as perdas de bovinos acometidos pela raiva são estimadas em aproximadamente 850.000 cabeças, que equivalem aproximadamente a 17 milhões de dólares (LIMA *et al.*, 2005). Em um estudo retrospectivo sobre doenças do sistema nervoso central de bovinos no Rio Grande do Sul a raiva representou 49,51% das enfermidades inflamatórias causadas por vírus (SANCHES *et al.*, 2000). No Brasil o *Desmodus rotundus* é a principal espécie de morcego hematófago que transmite a raiva,

porém outras espécies (*Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata*) podem participar da epidemiologia da doença (FUNASA, 1996).

Os morcegos hematófagos podem ser o veículo mais eficiente de propagação do vírus da raiva para os animais de produção, pois eles os agridem diariamente (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Nas décadas de 10 até 40 a raiva bovina esteve localizada principalmente no litoral brasileiro, possivelmente associada aos processos de ocupação do solo nessa região. A devastação da mata atlântica para aproveitamento de terras mais férteis, a introdução da pecuária bovina e a construção de novas ferrovias, rodovias, barragens, túneis, cisternas, canalizações de córregos e rios foram fatores que alteraram o nicho ecológico dos morcegos, em especial dos hematófagos (SILVA *et al.*, 2001). Condições climáticas favoráveis, presença de abrigos naturais (cavernas, ocos de árvores) ou abrigos artificiais (túneis, bueiros, construções abandonadas) e a distribuição da população de bovinos são responsáveis pela estabilidade enzoótica da raiva em uma determinada região (BARROS *et al.*, 2006).

Nas espécies ovina e caprina a raiva tem sido rara, mas estes quando expostos experimentalmente ao vírus são altamente susceptíveis à infecção (LIMA *et al.*, 2005). No Estado do Rio Grande do Sul, nos anos de 1978-1982 foram diagnosticados pelo Laboratório Regional de Diagnóstico 4 surtos de raiva na espécie ovina, sendo que em dois deles os ovinos tinham sido mordidos por cães (RIET-CORREA *et al.*, 1983). Mais recentemente, na Universidade Federal de Santa Maria foram diagnosticados dois casos de raiva em ovinos transmitida por morcegos hematófagos (*D. rotundus*), (RECH *et al.*, 2006).

2.4 Patogenia

A raiva é transmitida para os animais pela inoculação do vírus contido na saliva por meio de mordida (SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995). O vírus pode estar na saliva antes mesmo do surgimento do quadro clínico (JONES; HUNT; KING, 2000). Outras maneiras menos frequentes de transmissão incluem a contaminação de feridas com saliva ou material infectado e a contaminação de mucosas (boca, narinas e olhos) (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Têm sido relatado casos de raiva humana onde a infecção ocorreu através de transplantes de córnea e órgãos sólidos como pulmão, fígado e rim (BURTON *et al.*, 2005; SRINIVASAN *et al.*, 2005;

BRONNERT *et al.*, 2007). Casos raros, da doença têm ocorrido em seres humanos que respiraram o ar numa caverna, onde habitavam milhares de morcegos (JONES; HUNT; KING, 2000).

O período de incubação da raiva varia de duas semanas a vários meses, e raramente passa de anos (CHARLTON *et al.*, 1997). O período de incubação é determinado principalmente pela patogenicidade da cepa viral, concentração do vírus no inoculo, pelo estado imunológico do animal e pelo local de inoculação, ou seja quanto mais próximo do SNC, mais rápido o acesso ao mesmo (JUBB; HUXTABLE, 1993). Mordidas na cabeça resultam geralmente em período de incubação mais curto do que as mordidas nas extremidades (RADOSTITS *et al.*, 2002). É proposto que o vírus da raiva primeiramente replica no local de inoculação (ZACHARY, 2007). Após a introdução profunda do vírus da raiva pela mordida de um animal raivoso, a multiplicação do vírus inicialmente ocorre nas células dos músculos estriados no local (RADOSTITS *et al.*, 2002). Logo após o vírus invade os neurônios motores através dos terminais axonais, progredindo de forma centrípeta seguindo fluxo axonal retrógrado (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). É sugerido que o vírus percorra de 12 a 100 mm por dia (ZACHARY, 2007). Os vírus que seguem via neurônios motores chegam aos cornos ventrais da medula espinhal e núcleos motores do tronco encefálico, que compõe o sistema nervoso central, em seguida ocorre a disseminação centrífuga, via transporte axonal anterógrado do vírus para os nervos periféricos (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007; ZACHARY, 2007) e invasão de tecidos com inervação abundante como as glândulas salivares, nas quais o vírus pode replicar-se no epitélio dos ácinos e ser eliminado junto com a saliva (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

2.5 Sinais Clínicos

A raiva pode cursar com uma forma furiosa e uma forma paralítica, sendo a primeira relacionada a lesões cerebrais e é mais freqüente em caninos. A raiva paralítica está associada a lesões da medula espinhal e tronco encefálico e é mais freqüente em herbívoros (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

Os sinais clínicos em bovinos caracterizam-se principalmente por incoordenação dos membros posteriores (RADOSTITS *et al.*, 2002; LANGOHR *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2005; RECH *et al.*, 2005), seguida de paresia (RONDON *et al.*,

1995; RADOSTITS *et al.*, 2002; RIET-CORREA; RIET-CORREA; SCHILD, 2002), qual posteriormente evolui para os membros torácicos (LIMA *et al.*, 2005) e finalmente, há decúbito, primeiro esternal e posteriormente lateral (LANGOHR *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2005; RECH *et al.*, 2005). Pode observar-se, também paresia ou paralisia da cauda e posteriormente perda do reflexo anal (LANGOHR *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2005; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

Podem ser observados alterações no tronco encefálico, como salivação (RONDON *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 2005; RECH *et al.*, 2005). O corrimento de saliva é um dos achados mais constantes (RADOSTITS *et al.*, 2002). Pode ocorrer, também, ataxia, dificuldade de deglutição, ausência de reflexo pupilar, estrabismo, nistagmo, flacidez da língua, paralisia do maxilar, trismo mandibular (LIMA *et al.*, 2005) ou diminuição dos reflexos palpebral e pupilar (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

Alguns bovinos podem apresentar lesões localizadas no cérebro, levando a apatia, anorexia, bruxismo (ranger de dentes), fotofobia, cegueira parcial e total, movimentos involuntários, movimentos de pedalagem, mudanças de atitude, tiques nervosos (LIMA *et al.*, 2005), agressividade e mugidos freqüentes (LANGOHR *et al.*, 2003; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Os movimentos de bocejar são descritos como tentativas mudas de urrar (RADOSTITS *et al.*, 2002). Pode ser observado, também, prurido intenso, em que o bovino manifesta irritação cutânea, lambendo-se constantemente, provavelmente em locais de mordida de morcegos (LANGOHR *et al.*, 2003). A morte geralmente ocorre 48 horas após o decúbito depois de um curso de seis a sete dias (RADOSTITS *et al.*, 2002).

Hudson *et al.* (1996), trabalhando com o quadro clínico da raiva em 20 bovinos inoculados experimentalmente, encontrou como sinais clínicos mais freqüente: sialorréia (100%), mudança de comportamento (100%), tremores musculares (80%), hiperestesia e hiperexcitabilidade (70%) e paralisia do trem posterior (60%). Martel *et al.* (1974) observou disfagia, salivação, desidratação, tenesmo, espasmo muscular e incoordenação dos membros posteriores.

Em eqüinos o quadro clínico é semelhante, caracterizando-se por depressão (RADOSTITS *et al.*, 2002; PIEREZAN *et al.*, 2007), incoordenação motora (LIMA *et al.*, 2005; PIEREZAN *et al.*, 2007), paralisia dos membros pélvicos e torácicos (LIMA *et al.*, 2005; PIEREZAN *et al.*, 2007), decúbito lateral (LIMA *et al.*, 2005), paralisia faríngea (GREEN *et al.*, 1992; RADOSTITS *et al.*, 2002), cegueira (PIEREZAN *et al.*,

2007), depressão, agressividade, galope desenfreado (LIMA *et al.*, 2005) e ataxia são freqüentes (GREEN *et al.*, 1992; LIMA *et al.*, 2005).

O quadro clínico de caprinos e ovinos são semelhantes aos dos bovinos, caracterizando-se principalmente por lesões medulares como paresia, paralisia dos membros, evoluindo para decúbito, mas sinais clínicos característicos de lesões do tronco encefálico, cerebelo e cérebro são também observados (LIMA *et al.*, 2005).

2.6 Achados de Necropsia

As lesões de raiva são geralmente limitadas ao sistema nervoso central (JONES; HUNT; KING, 2000; JUBB; HUXTABLE, 1993). Não há lesões macroscópicas de significado (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007), embora durante a necropsia, possam ser observados casos em que ocorre hiperemia das leptomeninges (BARROS *et al.*, 2006). Também pode-se observar lesões secundárias tais como pneumonia aspirativa e distensão da bexiga (MORI; LEMOS; KADRI, 2004; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). A distensão da bexiga por urina é resultante da paralisia do órgão (LANGOHR *et al.*, 2003) em consequência do envolvimento da medula espinhal na infecção pelo vírus da raiva (SHERMAN; SCHAAL, 1987). A pneumonia aspirativa é consequência da falsa via durante a deglutição ou regurgitação causada por disfagia neurológica (MORI; LEMOS; KADRI, 2004). Evidências de ferimentos ou automutilação e corpos estranhos no estômago são indicativos de raiva, principalmente nos monogástricos (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

2.7 Histopatologia

As lesões microscópicas mais significativas em animais com raiva ocorrem no sistema nervoso central e gânglios e nervos cranianos e espinhais (SWANEPOEL, 2004). Achados histopatológicos incluem meningoencefalite e meningomielite não-purulentas (PERL; GOOD, 1991; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007) com ganglioneurite dos gânglios e nervos cranianos e espinhais (SWANEPOEL, 2004). Os manguitos perivasculares característicos da raiva são formados principalmente por linfócitos, e em menor grau, macrófagos e plasmócitos (LANGOHR *et al.*, 2003; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Ocorre microgliose, degeneração neuronal e

ganglioneurite são também observados (ZACHARY, 2007). Foram descritas lesões espongiiformes no neurópilo da substância cinzenta em casos experimentais de raiva induzidos em jaritacas, raposas, vacas, cavalos e gatos (CHARLTON, 1984; CHARLTON *et al.*, 1987), sendo em bovinos semelhante à observada nas encefalopatias espongiiformes (FOLEY; ZACHARY, 1995). Na espécie bovina a vacuolização dos neurônios do núcleo vermelho do mesencéfalo e do núcleo habenular do diencéfalo é um achado incidental comum (McGILL; WELLS, 1993 *apud* LANGOHR *et al.*, 2003; GAVIER-WIDEN *et al.*, 2001 *apud* LANGOHR *et al.*, 2003). Um achado importante e patognomônico são as inclusões intracitoplasmáticas, também chamados de Corpúsculos de Negri (SWANEPOEL, 2004; ZACHARY, 2007). Os corpúsculos de Negri são inclusões virais, intracitoplasmáticas, redondas a ovais, com 0,25-27µm, eosinofílicas (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007) que podem ser pequenas e múltiplas ou grandes e únicas (LANGOHR *et al.*, 2003), podendo ser encontrados em diferentes áreas do sistema nervoso central, embora sejam mais comumente encontrados nas células de Purkinje do cerebelo em bovinos (LANGOHR *et al.*, 2003; SWANEPOEL, 2004; RADOSTITS *et al.*, 2002).

2.8 Diagnóstico e Diagnóstico Diferencial

O diagnóstico da raiva pode ser realizado por meio de técnicas histológicas, imunológicas e biológicas. Na prática, é mais generalizado uso combinado da pesquisa de inclusões celulares por histologia, a imunofluorescência e a inoculação intracerebral em camundongos (CÔRTEZ; PAIM; OLIVEIRA, 1979).

Em 1903, corpos de inclusão intracitoplasmáticos, foram descritos por Negri em neurônios de caninos, felinos e coelhos experimentalmente infectados com o vírus da raiva. Esses corpos de inclusão foram subseqüentemente denominados de corpúsculos de Negri e são aceitos como indicações específicas de infecção com o vírus da raiva (JONES; HUNT; KING, 2000). A freqüência em que os corpúsculos de Negri ocorrem é inversamente proporcional ao grau de inflamação (SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995). Sua presença e concentração dependem do estágio e curso da doença (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007) e não estão presentes em até 30% dos casos de raiva, pois certas cepas do vírus não produzem corpúsculos de Negri (JONES; HUNT; KING, 2000; LIMA *et al.*, 2005). Têm sido demonstrado corpúsculos de Negri

nos neurônios do gânglio trigêmeo (RECH *et al.*, 2006). Na espécie equina o aparecimento de corpúsculos de Negri são menos frequentes do que em bovinos (PEIXOTO *et al.*, 2000).

Tem sido documentado pseudo-corpúsculos de Negri, que são inclusões inespecíficas no núcleo geniculado lateral e no hipocampo de algumas espécies (SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995; JONES; HUNT; KING, 2000). A utilização de colorações especiais denominadas de Mann, Giemsa ou Sellers auxiliam a diferenciar os corpúsculos verdadeiros dos pseudo-corpúsculos (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

Atualmente o diagnóstico de raiva em animais e humanos deve ser confirmado por meio de exames laboratoriais. A forma mais adequada de diagnóstico é a imunofluorescência direta (JONES; HUNT; KING, 2000; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007), técnica que tem sensibilidade de 80 a 100% (ZIMMER *et al.*, 1990). Os testes de anticorpos fluorescentes, que empregam anticorpos monoclonais antiepítotos das proteínas do envelope do vírus da raiva são amplamente específicos (GEORGE, 1993). O teste é particularmente sensível com amostras de tecido frescos, mas pode ser usado também em tecidos fixados depois de tratamento com tripsina ou outras enzimas (BARNARD; VOGES, 1982). A principal vantagem deste teste é que o diagnóstico pode ser obtido em duas horas, mas requer a utilização de microscópio de luz ultravioleta, anticorpo anti-raiva conjugado com fluoresceína e pessoal treinado (WOLDEHIWET, 2005).

A inoculação intracerebral em camundongos neonatos é uma prova útil para o diagnóstico da raiva, porém tem a desvantagem de retardar o diagnóstico por pelo menos três semanas, que é o tempo necessário para a observação dos animais (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). O teste de ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) é outro meio de diagnóstico baseado na detecção do nucleocapsídeo do vírus da raiva em cérebros de animais infectados. Outros testes como a hibridização “in situ” têm contribuído para as pesquisas atuais com o vírus rábico (WOLDEHIWET, 2005).

Outra forma de diagnóstico para raiva é a soro-neutralização em camundongos (TABEL; CHARLTON, 1974; JOGAI; RADOTRA; BANERJEE, 2002; MIRANDA *et al.*, 2005). Em um caso de equino com sintomatologia nervosa no Canadá, os testes de imunofluorescência direta para raiva e inoculação intracerebral em camundongos foram

negativos e somente foi possível confirmar o diagnóstico por meio da soro-neutralização em camundongos (TABEL; CHARLTON, 1974).

No campo molecular a técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) (MCCOLL *et al.*, 1993), constitui um método alternativo eficiente para estudos diagnósticos e epidemiológicos do vírus da raiva, permitindo identificar as diferenças entre cepas do vírus (GERMANO, 1994) e tem sido utilizada também como um meio auxiliar de diagnóstico de raiva ante morte em humanos através de saliva (NAGARAJ *et al.*, 2006; CREPIN *et al.*, 1998) e líquido cefalorraquidiano (CREPIN *et al.*, 1998).

Em casos suspeitos de raiva as principais amostras a serem enviadas para o diagnóstico laboratorial são: 1) segmento da medula espinhal; 2) segmento do cerebelo; 3) segmento do tálamo e 4) metade caudal de um dos hemisférios telencefálicos, que devem ser conservados sob refrigeração ou se o tempo entre coleta e remessa passar de 24 horas, congelados (BARROS *et al.*, 2006).

A comparação de métodos histoquímicos, imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos tem revelado uma concordância mais perfeita entre a imunofluorescência e a inoculação intracerebral em camundongos, embora ocorram, esporadicamente resultados falsos negativos ora em uma, ora em outra técnica (CÔRTEZ; PAIM; OLIVEIRA, 1979).

Com a aplicação da técnica de imunofluorescência, têm surgido nas últimas décadas numerosos procedimentos aplicáveis ao indivíduo ainda vivo para o diagnóstico da raiva. (VALLONE *et al.*, 1966 *apud* CÔRTEZ; NILSSON; VASCONCELLOS, 1978) diagnosticaram a raiva “in vivo” pela IFD aplicada ao sedimento da saliva de dois meninos acometidos pela raiva. Schneider (1968) descreveu pela primeira vez, um teste eficiente para diagnóstico da raiva “in vivo” denominado de “teste da córnea”, utilizando impressões de córnea de camundongos inoculados e raposas com raiva espontânea. Reis *et al.* (1971), identificaram a presença do vírus rábico na córnea, humor aquoso e nervo óptico de humanos, bovinos, caninos e felinos com raiva através de imunofluorescência direta e inoculação em camundongos. Moreira; Reis (1975) pesquisaram o vírus rábico no humor aquoso, saliva, glândula salivar submandibular e córnea de bezerros inoculados experimentalmente. Bauer (1975) apresentou a possibilidade de diagnóstico da raiva “in vivo” em caninos e bovinos com sintomas da doença, através da secreção nasal colhida com “swab” e submetido à imunofluorescência e inoculação intracerebral em camundongos.

Em alguns casos, o tecido cerebral pode ser negativo para o vírus da raiva utilizando técnicas diagnósticas padronizadas, mas os testes imunoistoquímicos podem detectar a presença do antígeno rábico (RADOSTITS *et al.*, 2002). Nos últimos 20 anos vários métodos imunoistoquímicos de detecção de antígenos da raiva em tecidos fixados em formol têm sido descritos e designados para estudos da patogenia do vírus e para o diagnóstico da doença em humanos e animais (JACKSON; REIMER, 1989; HAMIR; MOSER; RUPPRECHT, 1992; HAMIR *et al.*, 1996; LÓPEZ *et al.*, 1998-2001; WOLDEHIWET, 2005). A imunoperoxidase direta ou o complexo avidina-biotina (ABC) e o método Peroxidase anti-peroxidase (PAP), têm a vantagem de serem métodos simples podendo ser usados em materiais fixados em formol (WOLDEHIWET, 2005).

A técnica de imunoistoquímica tem sido utilizada, também, como um rápido diagnóstico ante-mortem usando-se biópsias de pele (BAGÓ; REVILLA-FERNANDEZ; ALLERBERGER, 2005). O vírus da raiva já foi encontrado por meio da técnica de imunoistoquímica no sistema nervoso central (ZIMMER *et al.*, 1990; HAMIR; MOSER, 1994; VURAL; ALCIGIR; BERKIN, 2001) na língua (HAMIR; MOSER; RUPPRECHT, 1992), glândula adrenal, coração, trato gastrointestinal e pâncreas (HAMIR; MOSER; RUPPRECHT, 1992; JOGAI; RADOTRA; BANERJEE, 2002).

Deve-se realizar o diagnóstico diferencial de outras doenças que cursam com sinais neurológicos. Nas espécies bovina e equina é importante diferenciar de intoxicações por plantas hepatotóxicas que causam encefalopatia hepática, principalmente *Senecio* spp. (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000) e *Crotalaria* spp. (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007), além de botulismo (RADOSTITS *et al.*, 2002; MORI; LEMOS; KADRI, 2004), listeriose, tétano, encefalite por Herpesvírus bovino-5, intoxicação por chumbo, polioencefalomalacia (RADOSTITS *et al.*, 2002), febre catarral maligna e doença de Aujeszky (pseudo-raiva) (MORI; LEMOS; KADRI, 2004). Em equinos deve-se diferenciar também das encefalomyelites virais dos equinos (BARROS, 2007) e da mieloencefalite por protozoários (RADOSTITS *et al.*, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Otimização da técnica de imunoistoquímica (IHQ) para raiva

Foram utilizadas amostras de sistema nervoso central (SNC) de 2 bovinos registrados no arquivo do programa DXSNC do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) e 3 amostras enviadas pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras (SPV-UFLA) de necropsias de casos de bovinos infectados naturalmente com raiva, os quais resultaram positivos nos testes de Imunofluorescência direta (IFD) ou na prova de inoculação intracerebral em camundongos (IIC).

Uma amostra de SNC de cada bovino necropsiado foi fixada em formol 10%, processada rotineiramente para exame histopatológico, incluída em parafina, cortada a 5µm de espessura e coradas pela hematoxilina-eosina (HE) (PROPHET *et al.*, 1992). Dados sobre os históricos, sinais clínicos, sexo e idade dos animais afetados foram obtidos com o veterinário requisitante ou pela própria equipe do SPV.

Para a otimização da técnica de imunoistoquímica para raiva foram feitos cortes histológicos de 5 µm de espessura e aplicados sobre lâminas positivadas ((ImmunoSlide-EasyPath), secadas verticalmente em temperatura ambiente, antes de aquecê-las em estufa a 60⁰C por 3 a 4 horas. Após os cortes foram desparafinados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool até a água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada por 15 minutos em temperatura ambiente e lavados em água destilada três vezes por dois minutos. Para a recuperação antigênica foram avaliados os seguintes reagentes: Protease XIV (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Proteinase K (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) e Tampão Citrato (2,1 gramas de ácido cítrico em 1 litro de água destilada, ajustando o pH em 6,0 com NaOH a 0,5%). Após as lâminas foram tratadas com protease XIV a 0,005% em PBS (phosphate buffered saline) (pH 7,4) por 15 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente. Os cortes foram tratados com proteinase K que foi preparada com 40µl da solução em 2ml 0,05M Tris-HCL pH 7,5 por 1 minuto em câmara úmida e temperatura ambiente. As lâminas foram colocadas em jarras de coloração de polipropileno com

solução de tampão citrato 10mM (pH 6,0) durante 15 minutos em panela de uso comercial de aço inox com dimensões de 24x20x20 (altura x largura x comprimento) com capacidade para dois litros previamente aquecido em banho-maria atingindo uma temperatura de 100⁰C e logo após as lâminas ficaram esfriando por 5 minutos em temperatura ambiente.

Para a diminuição das ligações inespecíficas (background), os cortes foram tratados com leite desnatado (Molico®) 5% diluído em água destilada durante 15 minutos. Os cortes foram cobertos com solução contendo o anticorpo primário na diluição de 1:500 e 1:1000 em PBS. Foram avaliados dois anticorpos monoclonais anti-raiva (mAbGTX21002 e Biodesign C86307M) e um anticorpo policlonal [anti-rabies polyclonal Chemicon #5199 adaptado de RECH (2007)]. Os cortes testados com os anticorpos monoclonais foram incubados em câmara úmida em “overnight” a 4⁰C e os testados com o anticorpo policlonal foram incubados em câmara úmida a 37⁰C por 60 minutos. Foram inseridos controles positivo e negativo de casos anteriormente comprovados pela IFD respectivamente. Posteriormente, foram lavados em água destilada e tratados com anticorpo secundário biotinalado (DAKO LSAB 2 kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA) por 20 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente. Logo após foram lavados em água destilada e tratados com o conjugado Streptavidina-peroxidase (DAKO) por mais 20 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente, lavados novamente e submetidos à revelação com o cromógeno (VECTOR® NovaRED) por 5 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada e contra-corados com hematoxilina de Harris por 1 minuto, posteriormente lavadas em água corrente por 1-2 minutos e desidratados em graduações de álcool, clarificadas em xilol e montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA). Em seguida as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico e classificadas de acordo com a intensidade de marcação em 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (acentuado).

Protocolo imunistoquímico utilizado no estudo para o diagnóstico de raiva em Herbívoros:

1. Xilol I e II por 20 minutos cada;
2. Álcool 100% 2min;
3. Álcool 96% 2min;
4. Álcool 80% 2min;

5. Álcool 70% 2min;
6. Água destilada;
7. Peróxido de Hidrogênio 3% por 15 minutos (diluir em água destilada até uma concentração final de 3%=3ml H₂O₂ em 97 ml água destilada);
8. Lavar com água destilada;
9. Recuperação antigênica: Tampão Citrato 10mM (pH 6,0) por 10 minutos a 100⁰C em panela de uso comercial; Proteinase K por 1 minuto em temperatura ambiente; Protease XIV por 15 minutos em temperatura ambiente.
10. Lavar com água destilada;
11. Bloqueio de reações inespecíficas: Leite desnatado 5% (diluir em água destilada) por 15 minutos;
12. Lavar com água destilada;
13. Anticorpo primário Raiva: 1/500 e 1/1000 diluído em PBS; 1 hora em estufa a 37⁰C (Ac policlonal) ou “*overnight*” por 14 a 16 horas (4⁰C em refrigeração) (Ac monoclonal). Usar 100µl por lâmina;
14. Lavar com água destilada;
15. Gotas amarelas (anticorpo secundário) 20 minutos em temperatura ambiente (suficiente para cobrir o corte);
16. Lavar com água destilada;
17. Gotas vermelhas (streptavidina) por 20 minutos em temperatura ambiente (suficiente para cobrir o corte);
18. Lavar com água destilada;
19. Cobrir com vermelho (Vector NovaRED). Deixar por 5 minutos ou até ficar vermelho;
20. Lavar com água destilada;
21. Contra corar com hematoxilina (1 minuto);
22. Lavar em água corrente por 1-2 minutos;
23. Desidratar em álcool 80%, 96% e 100% por 2 minutos cada;
24. Xilol III e IV
25. Montar a lâmina;
26. Leitura em microscópio óptico.

3.2 Mapeamento das regiões do Sistema Nervoso Central para estudo histoquímico e imunoistoquímico de bovinos e eqüinos com raiva

Esse estudo tem o objetivo de apreciar as alterações histopatológicas e imunoistoquímicas de diferentes segmentos do sistema nervoso central de bovinos e eqüinos acometidos com raiva natural. Foram avaliados 12 amostras de SNC de bovinos e 3 de eqüinos naturalmente infectados com o vírus da raiva. Oito amostras de bovinos e 3 de eqüinos vieram do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Mato Grosso (LPV-UFMT), acompanhadas de histórico, sinais clínicos, raça, idade e sexo dos animais afetados. Um hemisfério cerebral de cada animal, após ser fixado em formol 10%, com tempo médio de fixação de 24 horas a uma semana foi submetido a 14 cortes transversais (figuras 1 e 2). Os cortes transversais analisados neste estudo foram: 1) medula espinhal, 2) óbex, 3) pedúnculo cerebelar rostral, 4) pedúnculo cerebelar caudal, 5) pedúnculo cerebelar medial, 6) cerebelo, 7) colículo caudal, 8) colículo rostral, 9) tálamo, 10) hipocampo, 11) telencéfalo frontal, 12) telencéfalo parietal, 13) telencéfalo temporal, 14) telencéfalo occipital e em alguns casos foi adicionado o gânglio trigêmeo (figura 3). Os cortes foram processados de forma rotineira para histologia, cortados a 5 µm de espessura e colados sobre lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath), secadas verticalmente em temperatura ambiente, antes de aquecê-las em estufa a 60⁰C por 3 a 4 horas. Os cortes histológicos foram avaliados qualitativa e quantitativamente. No primeiro caso foi avaliado a natureza das lesões como presença de infiltrado inflamatório nas meninges, manguitos perivasculares, microgliose, degeneração e necrose neuronal, neuronofagia, satellitose e presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (corpúsculo de Negri) e cada caso foi atribuído graus de intensidade desde 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) 3 (acentuado).

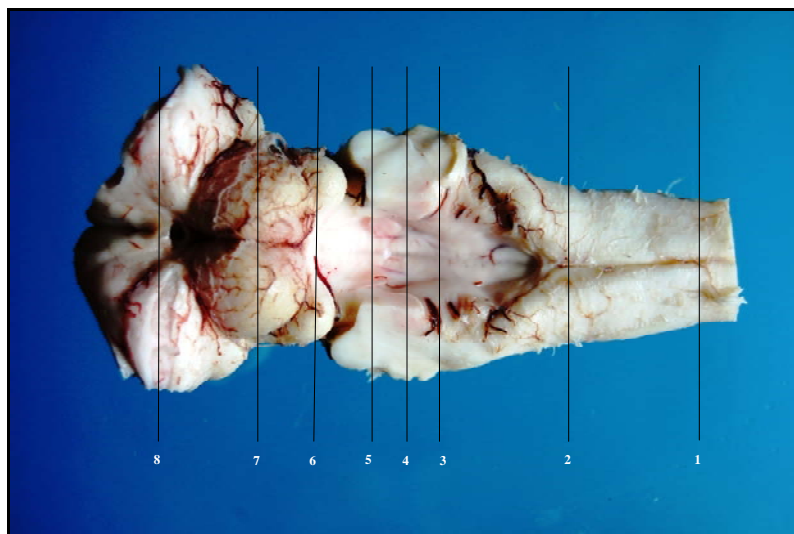


Figura 1 – Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Cortes seriados do SNC de bovino. Vista dorsal. 1: medula espinhal; 2: óbex; 3: pedúnculo cerebelar rostral; 4: pedúnculo cerebelar caudal; 5: pedúnculo cerebelar medial; 6: colículo caudal; 7: colículo rostral e 8: tálamo.

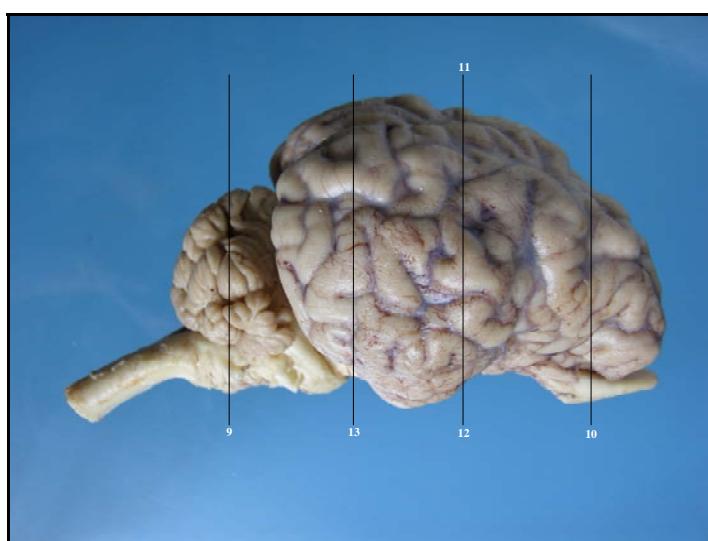


Figura 2 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Cortes seriados do SNC de bovino. 9: cerebelo; 10: telencéfalo frontal; 11: telencéfalo parietal; 12: telencéfalo temporal; 13: telencéfalo occipital.

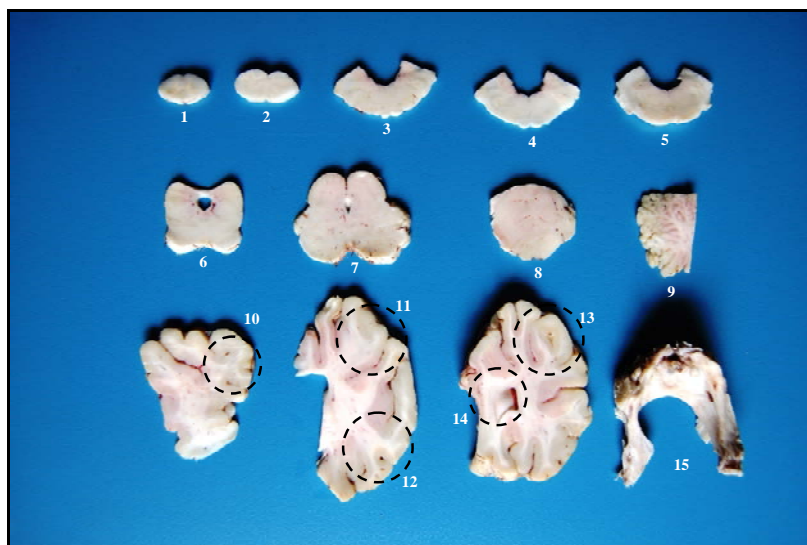


Figura 3 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Cortes utilizados para o estudo histológico e imunoistoquímico de bovinos e eqüinos com raiva. 1: medula espinhal; 2: secção do bulbo na altura do óbex; 3: pedúnculo cerebelar rostral; 4: pedúnculo cerebelar caudal; 5: pedúnculo cerebelar medial; 6: colículo caudal; 7: colículo rostral; 8: tálamo; 9: cerebelo; 10: telencéfalo frontal; 11: telencéfalo parietal; 12: telencéfalo temporal; 13: telencéfalo occipital; 14: hipocampo e 15: gânglio trigêmeo.

Adicionalmente cada corte foi submetido a técnica de imunoistoquímica para raiva utilizando-se recuperação antigênica com calor e solução de tampão citrato 10mM (pH 6,0) e como anticorpo primário foi utilizado o anticorpo policlonal (anti-rabies polyclonal Chemicon #5199) na diluição de 1: 1000 em PBS (phosphate buffered saline) durante 60 minutos em estufa a 37⁰C. Como cromógeno foi utilizado o (VECTOR[®]NovaRED) por 5 minutos. As lâminas foram lidas em microscópio óptico e analisadas quanto à intensidade e distribuição das marcações no SNC. Como controle positivo foi utilizado um corte histológico de SNC de um bovino acometido por raiva e com resultado positivo na imunofluorescência direta e imunoistoquímica. A intensidade de marcação foram atribuídos os graus de 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (acentuado).

3.3 Análise histopatológica e imunoistoquímica do sistema nervoso de herbívoros acometidos por raiva diagnosticados pelo SPV-UFRGS

Para esta etapa foi realizado um estudo retrospectivo de casos de bovinos com raiva através do programa DXSNC-MAPA e de casos de raiva natural em eqüinos retirados do arquivo de necropsias e biópsias do SPV-UFRGS, ambos no período de 2002-2007. Neste estudo foram processadas 30 amostras de SNC de bovinos e 2 amostras de eqüinos. As amostras de SNC dos bovinos e eqüinos foram fixados em formol 10%, processados rotineiramente para exame histopatológico, incluídos em parafina, cortados a 5µm de espessura e corados pela hematoxilina-eosina (HE) (PROPHET *et al.*, 1992). Adicionalmente fragmentos de SNC foram submetidos à técnica de imunoistoquímica (IHQ) com protocolo otimizado utilizando-se anticorpo primário policlonal (Chemicon #5199) na diluição de 1:1000. A revelação dos cortes foi realizada com o cromógeno (VECTOR NovaRED[®]) por 5 minutos em temperatura ambiente.

4. RESULTADOS

4.1 Otimização da técnica de IHQ

Os dados referentes à procedência da amostra, idade, sexo, raça, quadro clínico e lesões histopatológicas observadas nos bovinos com raiva estão representados na tabela 2. O teste de imunofluorescência direta para raiva foi positivo em todos os casos analisados e serviu de padrão para avaliação do método imunoistoquímico.

A detecção de antígeno rábico nas amostras analisadas foi possível com os três anticorpos utilizados. Em geral, os resultados usando o anticorpo policlonal foi superior aos anticorpos monoclonais. O anticorpo policlonal (Chemicon #5199) demonstrou bons resultados com os três protocolos de recuperação antigênica, porém teve maior intensidade de marcação quando utilizado calor com solução de tampão citrato, obtendo-se grau de marcação acentuado nos casos testados (figura 4). Pode-se identificar marcação no pericário, axônios (figura 5) e algumas vezes em dendritos dos neurônios. Recuperação antigênica com protease XIV e proteinase K obtiveram intensidade de marcação semelhantes, prevalecendo uma marcação moderada em ambos tratamentos enzimáticos. Na tabela 3 estão representados os graus de intensidade de marcação imunoistoquímica com o anticorpo policlonal nos cinco casos analisados no presente estudo.

Tabela 2 - Achados clínicos, patológicos, e de imunofluorescência direta de materiais provenientes de cinco bovinos com suspeita de raiva encaminhados ao Setor de Patologia Veterinária UFRGS.

Caso n ^o	Procedência	Idade (anos)	Sexo	Raça	Sinais clínicos	Morte	Lesões H&E	IFD
1	UFLA	4	F	SRD	Incoordenação dos membros posteriores, decúbito	N	ME; CI; GN	+
2	UFLA	5	F	SRD	Incoordenação dos membros posteriores, decúbito, opistótomos, nistágmo, pedalagem	E	ME; CI	+
3	UFLA	5	F	SRD	Sialorréia, incoordenação dos membros posteriores, decúbito esternal, morte	N	HE; ME; CI; MP	+
4	UFRGS	3	M	NI	Incoordenação, salivação, decúbito, mugido e morte	N	ME	+
5	UFRGS	8	F	PS	Incoordenação, decúbito	NI	ME	+
6 ^c	UFRGS	0,5	F	Ne	Incoordenação dos membros posteriores, agressividade, tremores musculares, salivação, decúbito e morte	N	ME; CI	+

F: fêmea; M: macho; SRD: sem raça definida; PS: Pardo-Suíço; Ne: Nelore; NI: não informado; N: natural; E: eutanásia; ME: Meningoencefalite; CI: corpúsculo de inclusão; GN: ganglioneurite; HE: hemorragia; MP: manguito perivascular; +: positivo; ^c: controle positivo; IFD: imunofluorescência direta.

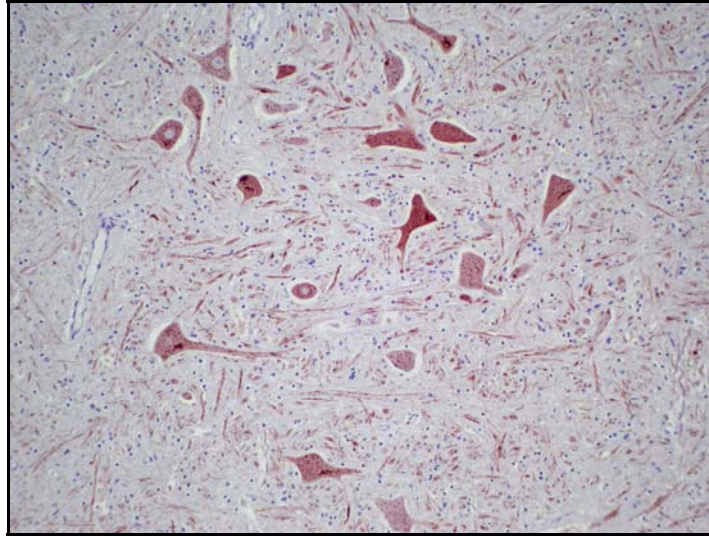


Figura 4 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Medula espinhal. Marcação acentuada de coloração vermelha em neurônios. Recuperação antigênica com calor e tampão citrato. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 10.

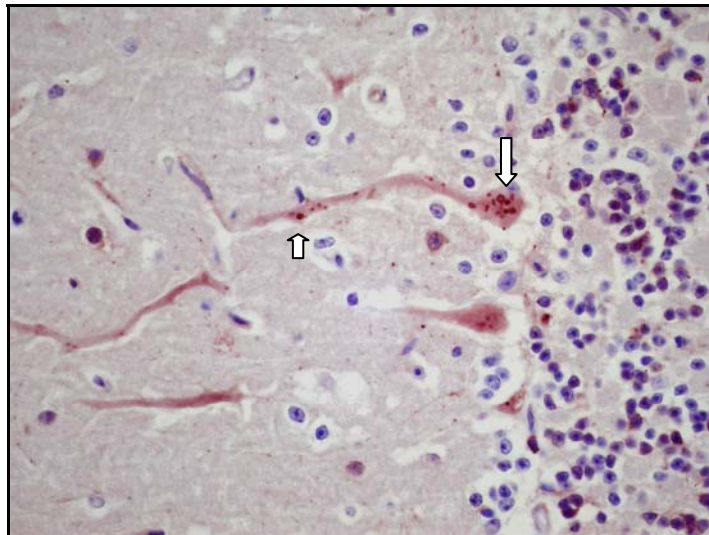


Figura 5 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Cerebelo. Presença de marcação de coloração vermelha em corpúsculos de inclusão viral no pericário (seta maior) e axônio (seta menor) de célula de Purkinje. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 20.

Tabela 3 - Resultados imunistoquímicos obtidos com a utilização do anticorpo policlonal (Chemicon #5199) utilizando três recuperações antigênicas.

N ^o Caso	Recuperação antigênica					
	<u>Protease XIV</u>		<u>Proteinase K</u>		<u>Calor</u>	
	1/500	1/1000	1/500	1/1000	1/500	1/1000
1	2	2	2	2	3	3
2	2	2	2	2	3	1
3	2	2	2	2	3	3
4	1	1	1	1	3	3
5	3	1	2	1	3	3
6 ^c	1	1	3	3	3	3

1: marcação leve, 2: marcação moderada, 3: marcação acentuada, ^c: controle positivo.

A digestão com protease XIV e proteinase K apresentaram baixa intensidade de marcação com os anticorpos monoclonais. O anticorpo Genetex apresentou marcação leve nas recuperações antigênicas com protease XIV (figura 6) e proteinase K (figura 7) e o anticorpo Biodesign obteve melhor marcação quando utilizado proteinase K (figura 8), ambos na diluição de 1:500. A intensidade de marcação com o anticorpo GeneTex (GTX 21002) e Biodesign (C86307M) estão representados nas tabelas 4 e 5 respectivamente.

Na recuperação antigênica com calor (tampão citrato) os dois anticorpos monoclonais apresentaram ausência de marcação. Todos os casos que foram positivos na técnica de imunistoquímica demonstraram a presença do antígeno viral no citoplasma de neurônios na forma de agregados de grânulos (figura 9) também na forma redonda ou oval, mostrando corpúsculo de inclusão viral único a múltiplos nos neurônios (figura 10) e somente o neurônio marcado (figura 11).

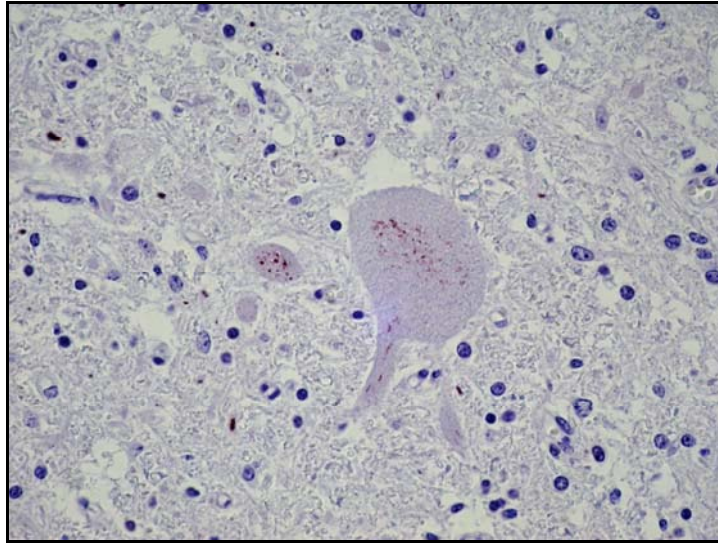


Figura 6 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Medula espinhal. Recuperação antigênica com protease XIV. Observa-se leve marcação em neurônio. Anticorpo monoclonal GeneTex (GTX 21002) 1:500. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 40.

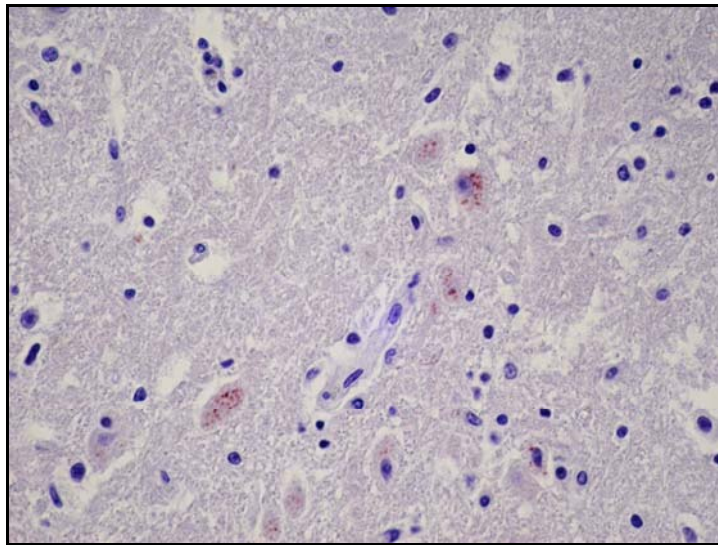


Figura 7 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Tálamo. Recuperação antigênica com proteinase K. Observa-se marcação leve em neurônios. Anticorpo monoclonal GeneTex (GTX 21002) 1:500. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 40.

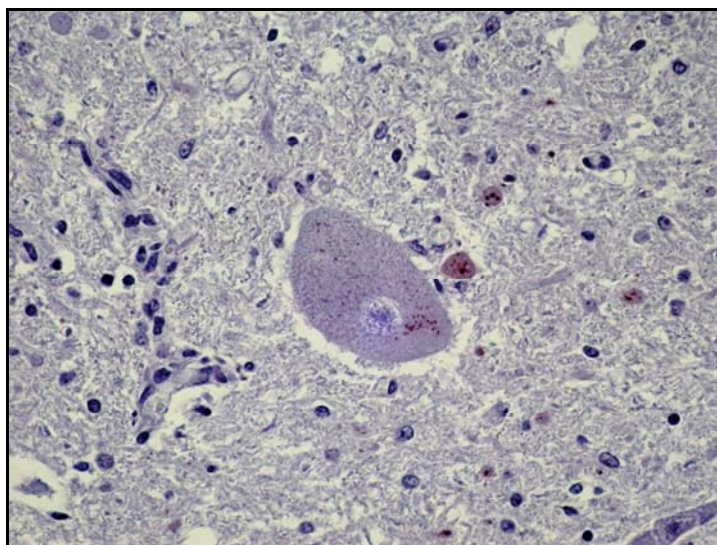


Figura 8 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Medula espinhal. Recuperação antigênica com proteinase K. Observa-se marcação leve em neurônio. Anticorpo monoclonal Bidesign (C86307M) 1:500. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 40.

Tabela 4 - Resultados imunoistoquímicos obtidos com a utilização do anticorpo monoclonal (GTX 21002) utilizando três recuperações antigênicas.

N ^o Caso	Recuperação antigênica					
	<u>Protease XIV</u>		<u>Proteinase K</u>		<u>Calor</u>	
	1/500	1/1000	1/500	1/1000	1/500	1/1000
1	1	1	1	1	0	0
2	1	1	1	1	0	0
3	1	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	1	1	1	1	0	0
6 ^c	0	0	1	1	0	0

0: ausência de marcação, 1: marcação leve, ^c: controle positivo.

Tabela 5 - Resultados imunohistoquímicos obtidos com a utilização do anticorpo monoclonal Biodesign (C86307M) utilizando três recuperações antigênicas.

N ^o Caso	Recuperação antigênica					
	<u>Protease XIV</u>		<u>Proteinase K</u>		<u>Calor</u>	
	1/500	1/1000	1/500	1/1000	1/500	1/1000
1	1	1	1	1	0	0
2	0	0	1	0	0	0
3	1	1	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	1	0	0	0
6 ^c	0	0	1	1	0	0

0: ausência de marcação, 1: marcação leve, ^c: controle positivo.

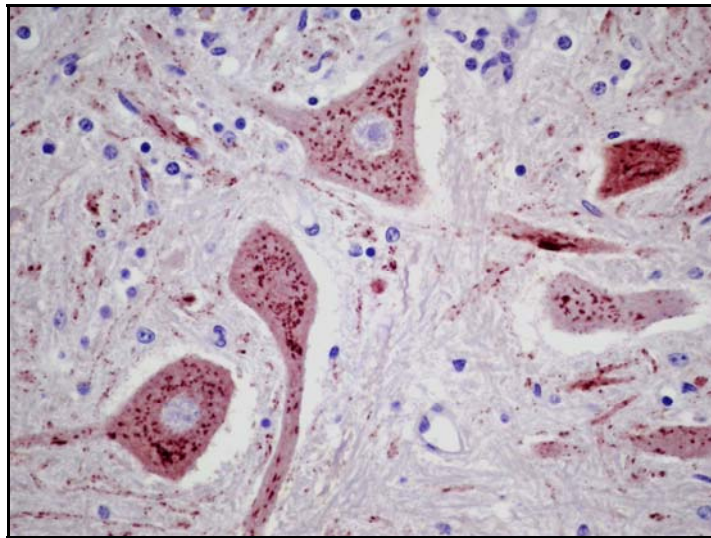


Figura 9 - Diagnóstico histológico e imunohistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Medula espinhal. Marcação acentuada de agregado de grânulos em neurônios corados em vermelho. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imunohistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 40.

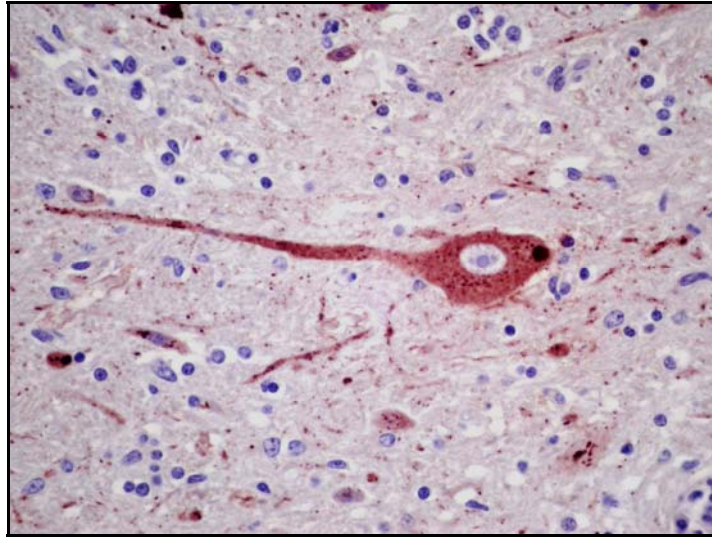


Figura 10 - Diagnóstico histológico e imunohistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Medula espinhal. Presença de corpúsculo de inclusão viral único em neurônio fortemente marcado. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 40.

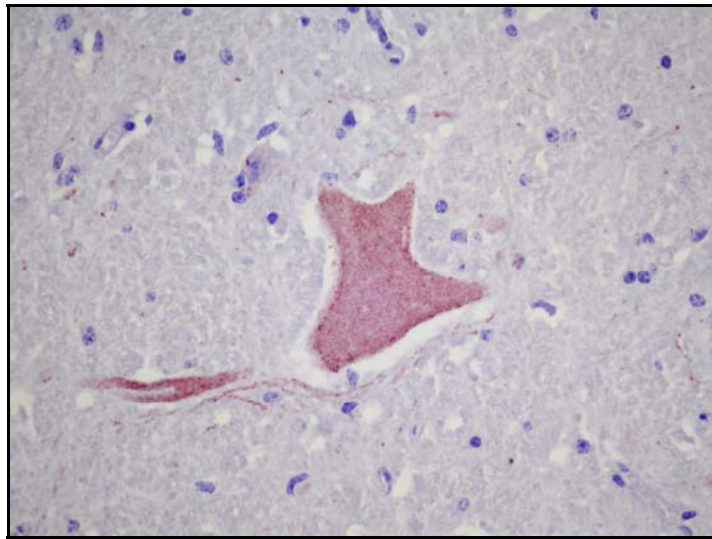


Figura 11 - Diagnóstico histológico e imunohistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Marcação acentuada de antígeno viral da raiva em neurônio. Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 40.

Na determinação da diluição do anticorpo policlonal anti-raiva, foram obtidos resultados positivos nas diluições de 1:500 e 1:1000. Perda na qualidade da

identificação do antígeno de raiva foi visualizado quando os anticorpos foram diluídos a 1:1500.

O bloqueio das reações inespecíficas mostrou-se bastante eficaz quando os cortes foram incubados com leite em pó desnatado (Molico®) 5% diluídos em água destilada durante 15 minutos.

Os controles positivo e negativo inseridos em cada procedimento de imunistoquímica apresentaram imunorreatividade positiva e negativa respectivamente quando testados com os três anticorpos.

4.2 Distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos e eqüinos com raiva

4.2.1 Epidemiologia e sinais clínicos de bovinos com raiva

Dez bovinos com raiva deste estudo foram provenientes do Estado de Mato Grosso (MT), sendo dois animais acometidos no ano de 2006 (bovinos números 10 e 11) e oito animais no ano de 2007 (bovinos 1 a 8), e dois no Estado do Rio Grande do Sul (bovinos 9 e 12) nos anos de 2006 e 2002 respectivamente. Não foi realizado IFD para raiva nos bovinos 10 e 11 e os demais apresentaram resultado de imunofluorescência direta positiva. A idade média dos bovinos foi de 3,5 anos, variando de 4 meses até 8 anos. A raça predominante deste estudo foi a Nelore (5/12), seguida de Jersey, Holandesa, Caracu, sem raça definida (SRD) e três animais com raça não informada. A média do curso clínico foi de 4,5 dias, variando de 3 dias a 7 dias. A forma clínica dos bovinos acometidos com raiva foi a parálitica. Os principais sinais clínicos relatados caracterizaram-se por incoordenação motora (4/10), paresia e posteriormente paralisia dos membros posteriores (3/10), decúbito esternal (2/10) e lateral (3/10), movimentos de pedalagem (6/10), opistótomos (4/10) e morte. Além desses, foram relatados também agressividade, sialorréia, trismo e nistagmo. Em dois animais não foram informados os sinais clínicos observados.

4.2.2 Histopatologia de bovinos com raiva

Os principais achados histopatológicos em bovinos caracterizaram-se por meningoencefalite não purulenta, microgliose focal, manguitos perivascularares (figura

12), degeneração e necrose neuronal (figura 13). Em alguns casos também foi observada a presença de micróglia ativada ao redor de neurônios (figura 14) que posteriormente resultava em neuronofagia (figura 15) e em seguida a área era ocupada por células mononucleares e micróglia. Vacuolização em neurônios também foi observada em alguns casos, principalmente no gânglio trigêmeo (figura 16). Corpúsculos de inclusão foram observados principalmente no gânglio trigêmeo com 100% (4/4) e cerebelo 58,33% (7/12), além de, pedúnculo cerebelar médio 45,45% (5/11), pedúnculo cerebelar rostral e pedúnculo cerebelar caudal com 36,36% (4/11), medula espinhal 33,33% (2/6), óbex 30% (3/10), hipocampo 27,27% (3/11), tálamo e colículo rostral com 16,66% (2/12) e colículo caudal com 9,09% (1/11). Esses corpúsculos de inclusão viral puderam ser observados em neurônios íntegros (figura 17), em processo de degeneração e também de necrose. Todos os corpúsculos apareceram de forma discreta a leve. Resultados referentes à localização e intensidade das lesões no SNC de bovinos estão representados na tabela 6.



Figura 12 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Pedúnculo cerebelar rostral. Presença de manguito perivascular focal moderado. Coloração de HE, Obj. 20.

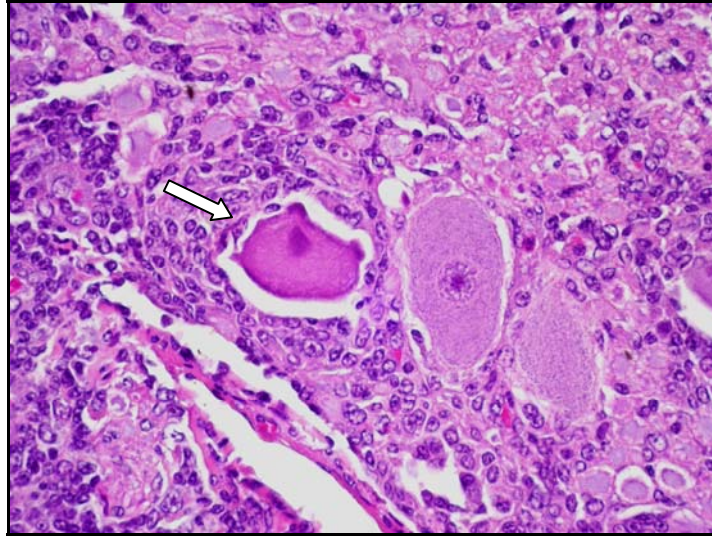


Figura 13 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Gânglio trigêmeo. Presença de neurônio necrótico (seta) e com infiltrado inflamatório mononuclear. Coloração de HE, Obj. 40.

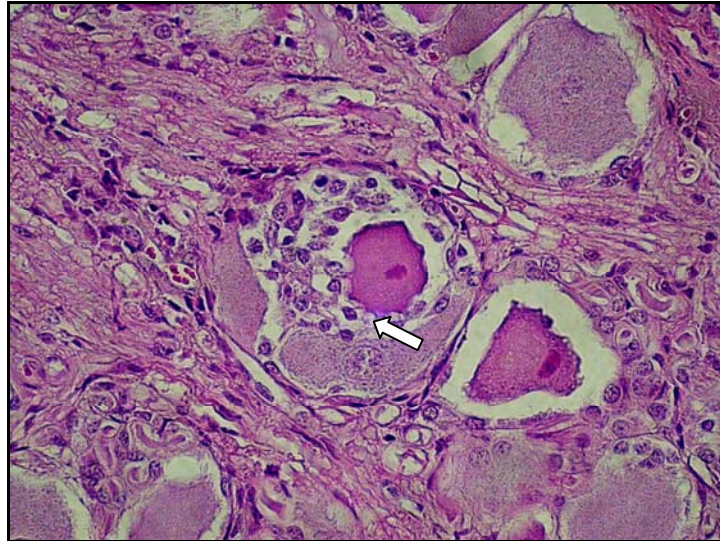


Figura 14 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Gânglio trigêmeo. Presença de micróglia ativada ao redor de neurônio (seta). Coloração de HE, Obj. 40.

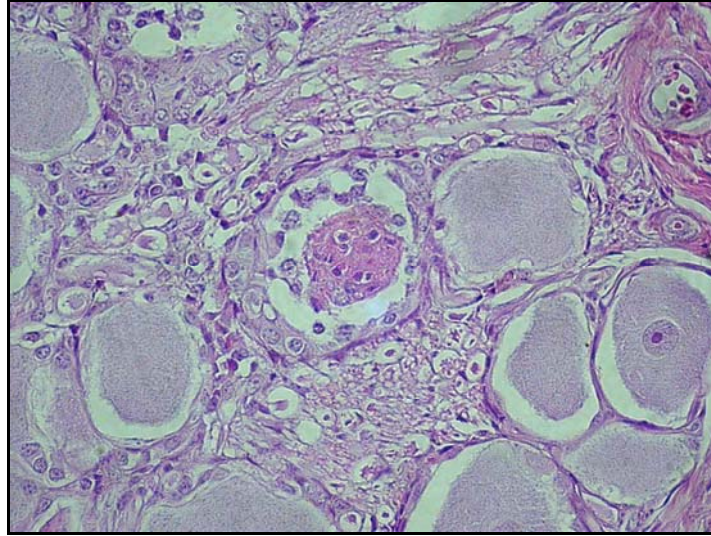


Figura 15 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Gânglio trigêmeo. Presença de neuronofagia. Coloração de HE, Obj. 40.

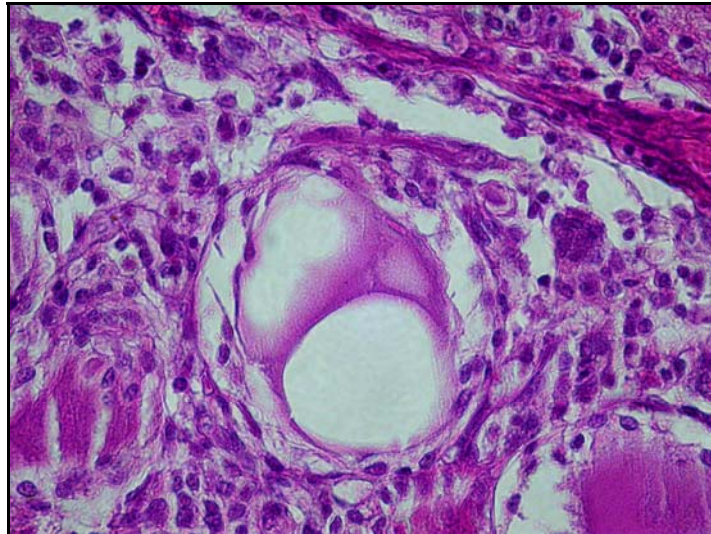


Figura 16 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Gânglio trigêmeo. Presença de vacúolos em neurônio. Coloração de HE, Obj. 100.

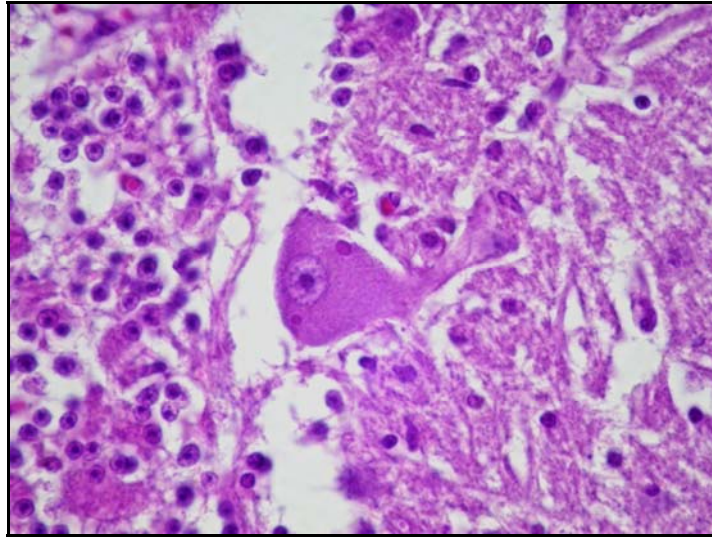


Figura 17 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Cerebelo. Presença de corpúsculos de Negri em célula de Purkinje. Coloração de HE, Obj. 40.

Tabela 6 - Localização e intensidade das lesões histológicas em bovinos com raiva.

Caso n ^o	MC	OB	PCR	PCC	PCM	CC	CR	TL	HC	CE	TF	TP	TT	TO	GT
1	2 ⁱ	2	1	1	1	2	1	1	0	1	1	1	1	0	1 ⁱ
2	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1 ⁱ
3	1	2	1	2	1 ⁱ	1	3	1 ⁱ	1 ⁱ	1 ⁱ	1	1	1	1	NA
4	NA	NA	2	2	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	NA
5	NA	1	2 ⁱ	1 ⁱ	1 ⁱ	2	2 ⁱ	1	1	1	2	1	1	1	2 ⁱ
6	1	1	NA	2 ⁱ	3	1	3	1	1	2 ⁱ	1	0	1	1	NA
7	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
8	NA	1 ⁱ	3	3	1 ⁱ	2	2	2	1 ⁱ	2 ⁱ	1	1	2	2	NA
9	NA	1 ⁱ	NA	2 ⁱ	NA	NA	1	1 ⁱ	1	1 ⁱ	0	1	1	0	NA
10	NA	2	1 ⁱ	2 ⁱ	2 ⁱ	2	2	1	NA	1 ⁱ	1	NA	NA	1	2 ⁱ
11	NA	2 ⁱ	1 ⁱ	1	2	1 ⁱ	2	2	1	2 ⁱ	1	1	1	1	NA
12	1 ⁱ	NA	2 ⁱ	NA	2 ⁱ	2	2 ⁱ	2 ⁱ	1 ⁱ	1 ⁱ	1	1	1	1	NA

MC: medula cervical, OB: óbex, PCR: pedúnculo cerebelar rostral, PCC: pedúnculo cerebelar caudal, PCM: pedúnculo cerebelar médio, CC: colículo caudal, CR: colículo rostral, TL: tálamo, HC: hipocampo, CE: cerebelo, TF: telencéfalo frontal, TP: telencéfalo parietal, TT: telencéfalo temporal, TO: telencéfalo occipital, GT: gânglio trigêmeo, 0: ausente, 1: leve, 2: moderado, 3: acentuado, ⁱ: corpúsculo de inclusão, NA: secção do SNC não avaliada.

4.2.3 Epidemiologia e sinais clínicos de eqüinos com raiva

O três casos de eqüinos com raiva deste estudo foram registrados no Estado de Mato Grosso (MT) entre os meses de maio a julho do ano de 2007. A idade média dos eqüinos foi de 0,8 anos, variando de 70 dias até 1,5 ano. Um eqüino era da raça Pantaneiro, um sem raça definida (SRD) e outro não foi informado a raça pelo requisitante. A média de evolução do quadro clínico foi de 4 dias. A evolução clínica do eqüino 1 foi de 5 dias seguido de morte, do eqüino 2 foi de cinco dias e do eqüino 3 foi de dois dias, seguidos de eutanásia. A forma clínica foi a parálítica.

Os principais sinais clínicos caracterizaram-se por incoordenação motora (3/3), paralisia dos membros posteriores (3/3), paresia dos membros anteriores (1/3), decúbito (3/3), paralisia da cauda (1/3), diminuição do tônus lingual (1/3) e depressão (1/3). Na necropsia o eqüino 1 apresentou a bexiga distendida devido a um acúmulo acentuado de urina. Na propriedade do eqüino 1 já haviam morrido desde o ano de 2006 aproximadamente 12 eqüinos com sinais clínicos similares a este animal. O eqüino 2 tinha sido vacinado para encefalomielite eqüina e raiva 4 dias antes de adoecer. Amostras de encéfalo e cerebelo do eqüino 3 foram encaminhados para exame de imunofluorescência direta (IFD) para raiva, no qual obteve-se resultado negativo. Os resultados de IFD dos eqüinos 1 e 2 foram positivos para raiva.

4.2.4 Histopatologia de eqüinos com raiva

Os principais achados histopatológicos caracterizaram-se por manguito perivascular, microgliose focal, degeneração e necrose neuronal e neuronofagia. Presença de inclusões intracitoplasmáticas (Corpúsculos de Negri) foram observados em 100% (3/3), com presença de corpúsculos de Negri na medula espinhal e pedúnculo cerebelar médio (eqüino 1), no cerebelo (eqüino 2) e na medula espinhal (eqüino 3). A intensidade das lesões distribuíram-se principalmente no tronco encefálico e medula espinhal. Dados referentes à localização e intensidade das lesões estão representados na tabela 7.

Tabela 7 - Localização e intensidade das lesões histológicas em eqüinos com raiva.

Caso n ^o	MC	OB	PCR	PCC	PCM	CC	CR	TL	HC	CE	TF	TP	TT	TO	GT
1	1 ⁱ	1	2	1	1 ⁱ	1	1 ⁱ	2	0	1	1	1	1	1	NA
2	2	1	1	1	1	1	NA	NA	NA	1 ⁱ	1	NA	NA	NA	2
3	2 ⁱ	0	NA	0	1	1	NA	NA	0	1	NA	1	NA	NA	1

MC: medula cervical, OB: óbex, PCR: pedúnculo cerebelar rostral, PCC: pedúnculo cerebelar caudal, PCM: pedúnculo cerebelar médio, CC: colículo caudal, CR: colículo rostral, TL: tálamo, HC: hipocampo, CE: cerebelo, TF: telencéfalo frontal, TP: telencéfalo parietal, TT: telencéfalo temporal, TO: telencéfalo occipital, GT: gânglio trigêmeo, 0: ausente, 1: leve, 2: moderado, ⁱ: corpúsculo de inclusão, NA: secção do SNC não avaliada.

4.2.5 Imunoistoquímica no SNC de bovinos com raiva

Os resultados obtidos na técnica de imunoistoquímica dos cortes seriados do SNC na espécie bovina estão representados na tabela 8. As melhores secções do SNC com melhor detecção do antígeno da raiva foram: Óbex, pedúnculo cerebelar rostral, pedúnculo cerebelar caudal, pedúnculo cerebelar medial, colículo caudal e gânglio trigêmeo, ambos com 100%, seguidos de medula espinhal, tálamo, cerebelo e telencéfalo frontal ambos com 83,33%, telencéfalo parietal (81,81%), colículo rostral (75%), hipocampo (72,72%), telencéfalo occipital (66,66%) e telencéfalo temporal (63,63%). A intensidade de marcação imunoistoquímica nos cortes seriados do SNC estão representados na figura 18. A imunoistoquímica demonstrou o vírus da raiva no axônio, dendritos e pericário de neurônios na forma de agregados de grânulos ou de forma redonda ou oval, mostrando corpúsculo de inclusão viral único a múltiplos nos neurônios. No gânglio trigêmeo dos bovinos testados pode-se observar marcação em neurônios íntegros (figura 19), neurônios degenerados (figura 20), em casos com neuronofagia (figura 21) e com vacuolização (figura 22).

Tabela 8 - Localização e intensidade de marcação imunoistoquímica em bovinos com raiva.

Caso n ^o	MC	OB	PCR	PCC	PCM	CC	CR	TL	HC	CE	TF	TP	TT	TO	GT
1	1	1	2	1	2	2	0	0	0	1	0	1	0	0	1
2	0	3	3	3	1	3	0	3	1	0	0	3	0	2	1
3	2	3	2	1	3	1	2	3	2	0	1	0	0	3	NA
4	NA	NA	3	3	3	3	3	3	2	3	2	1	2	1	NA
5	NA	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
6	2	3	NA	1	1	2	2	0	3	3	3	3	3	3	NA
7	2	1	3	1	3	2	1	2	1	2	1	3	3	2	NA
8	NA	3	2	3	2	1	2	3	0	1	3	3	2	0	NA
9	NA	1	NA	1	NA	NA	1	2	0	3	3	0	0	0	NA
10	NA	3	2	1	2	2	1	1	NA	1	1	NA	NA	0	3
11	NA	2	2	3	2	3	3	3	1	2	3	3	3	2	NA
12	1	NA	1	NA	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	NA

MC: medula cervical, OB: óbex, PCR: pedúnculo cerebelar rostral, PCC: pedúnculo cerebelar caudal, PCM: pedúnculo cerebelar médio, CC: colículo caudal, CR: colículo rostral, TL: tálamo, HC: hipocampo, CE: cerebelo, TF: telencéfalo frontal, TP: telencéfalo parietal, TT: telencéfalo temporal, TO: telencéfalo occipital, GT: gânglio trigêmeo, 0: ausência de marcação, 1: marcação leve, 2: marcação moderada e 3: marcação acentuada. NA: secção do SNC não avaliada.

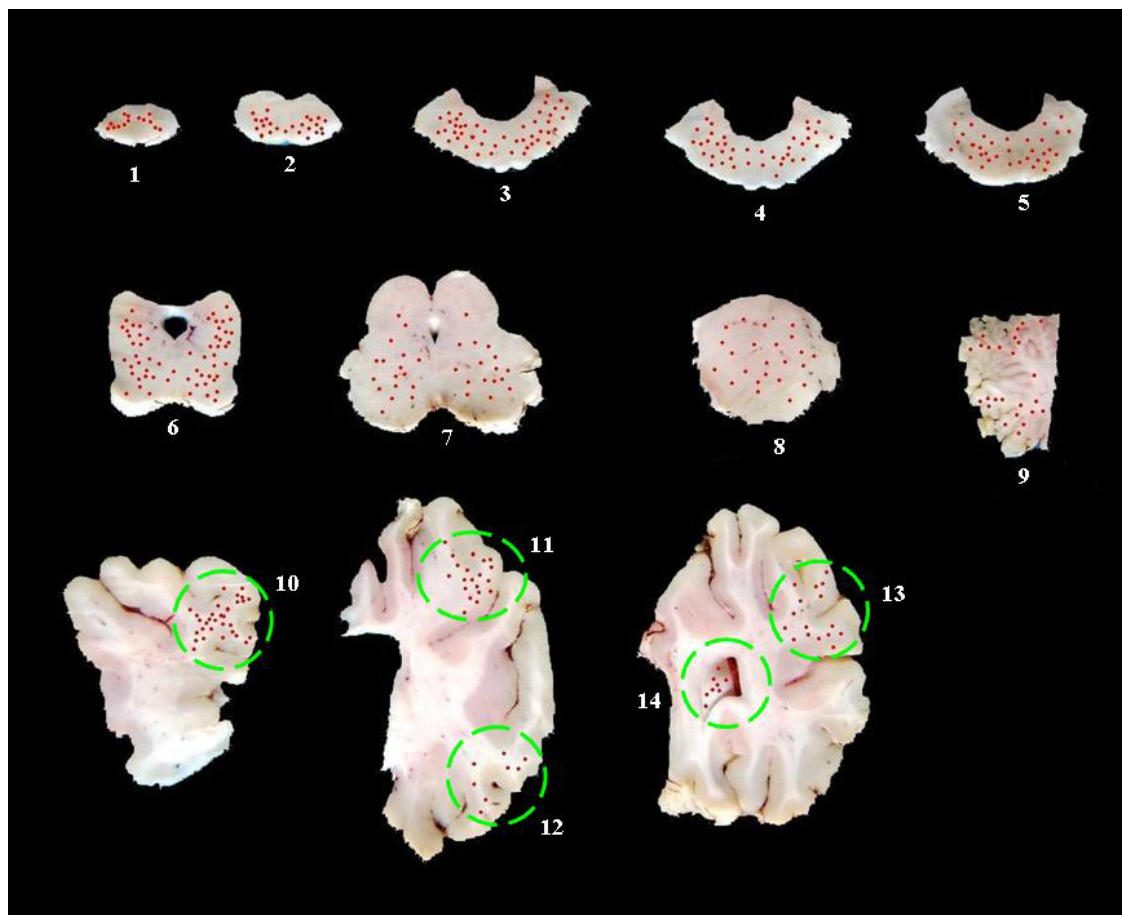


Figura 18 - Cortes utilizados para o estudo histológico e imunohistoquímico de bovinos e eqüinos com raiva. Cortes seriados de cérebro bovino. 1: medula espinhal; 2: secção do bulbo na altura do óbex; 3: pedúnculo cerebelar rostral; 4: pedúnculo cerebelar caudal; 5: pedúnculo cerebelar medial; 6: colículo caudal; 7: colículo rostral; 8: tálamo; 9: cerebello; 10: telencéfalo frontal; 11: telencéfalo parietal; 12: telencéfalo temporal; 13: telencéfalo occipital. Os pontos vermelhos representam a intensidade de marcação imunohistoquímica em cada corte histológico.

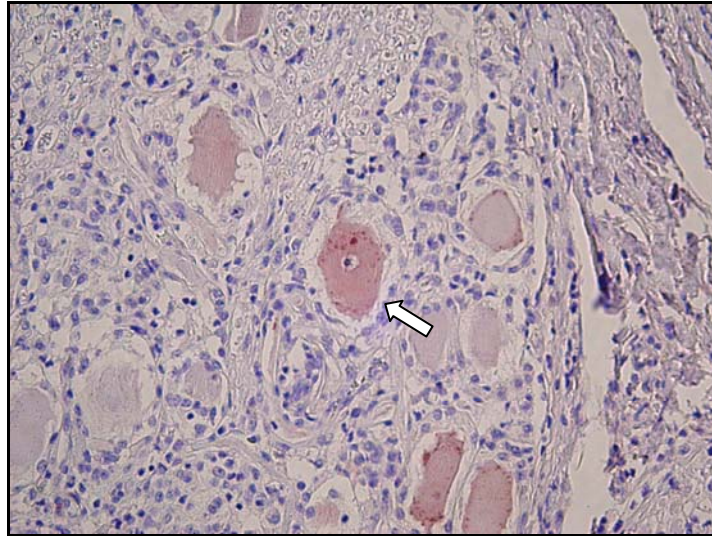


Figura 19 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Gânglio trigêmeo. Marcação positiva em neurônio íntegro (seta). Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 20.

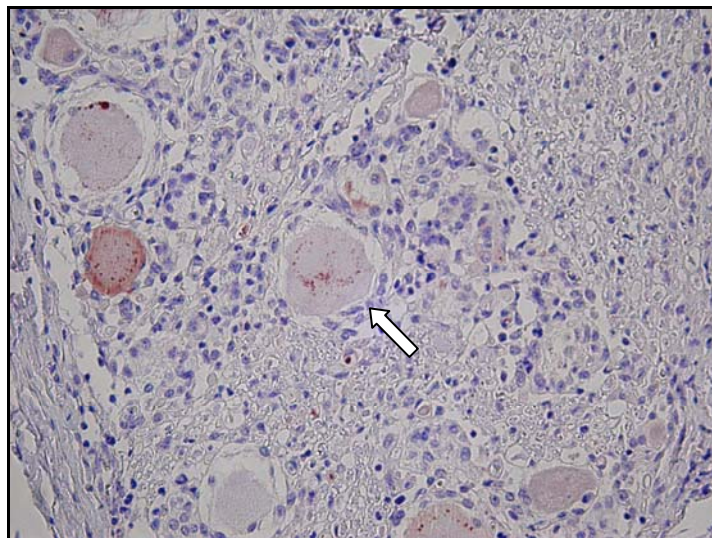


Figura 20 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Gânglio trigêmeo. Ao centro marcação positiva em neurônio degenerado (seta). Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 20.

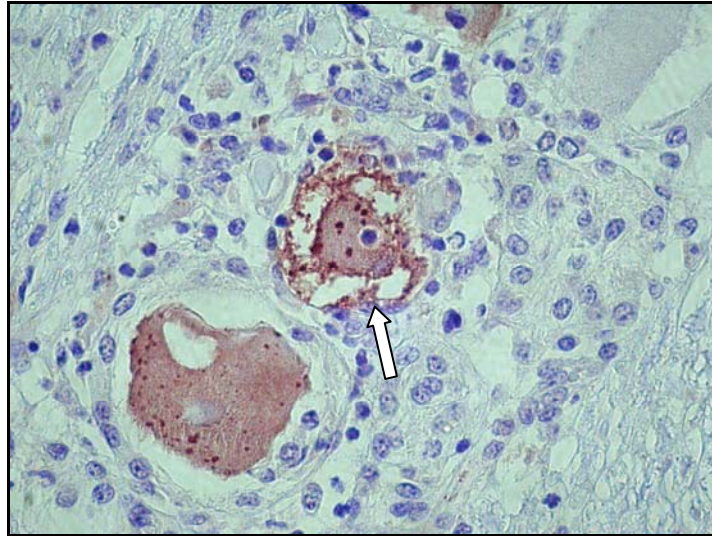


Figura 21 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Marcação positiva em neurônio em neuronofagia (seta). Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 40.

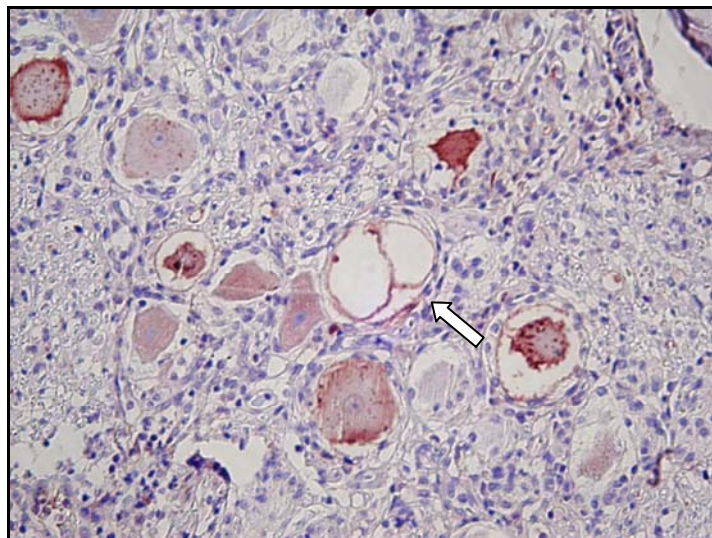


Figura 22 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Gânglio trigêmeo. Neurônio vacuolizado apresentando marcação positiva em vermelho (seta). Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 20.

4.2.6 Imunoistoquímica no SNC de eqüinos com raiva

Na espécie eqüina os melhores locais de marcação foram pedúnculo cerebelar rostral, colículo rostral, tálamo, telencéfalo occipital e telencéfalo temporal, com 100%

dos casos, seguidos de medula espinhal, óbex, pedúnculo cerebelar caudal, colículo caudal e cerebelo, todos com 66,66% dos casos, hipocampo, telencéfalo frontal e telencéfalo parietal com 50%. Pedúnculo cerebelar medial com 33,33%. Não houve marcação nos dois gânglios trigêmeos testados. Dados referentes à localização e intensidade de marcação nos três casos deste estudo estão representados na tabela 9. O equino 3 somente apresentou marcação leve de antígeno rábico na medula espinhal (figura 23).

Tabela 9 - Localização e intensidade de marcação imunoistoquímica em equinos com raiva.

Caso n ^o	MC	OB	PCR	PCC	PCM	CC	CR	TL	HC	CE	TF	TP	TT	TO	GT
1	0	2	1	3	0	3	1	2	3	1	3	3	3	1	NA
2	3	2	1	2	1	2	NA	NA	NA	3	0	NA	NA	NA	0
3	2	0	NA	0	0	0	NA	NA	0	0	NA	0	NA	NA	0

MC: medula cervical, OB: óbex, PCR: pedúnculo cerebelar rostral, PCC: pedúnculo cerebelar caudal, PCM: pedúnculo cerebelar médio, CC: colículo caudal, CR: colículo rostral, TL: tálamo, HC: hipocampo, CE: cerebelo, TF: telencéfalo frontal, TP: telencéfalo parietal, TT: telencéfalo temporal, TO: telencéfalo occipital, GT: gânglio trigêmeo, 0: ausência de marcação, 1: marcação leve, 2: marcação moderada e 3: marcação acentuada. NA: secção do SNC não avaliada.

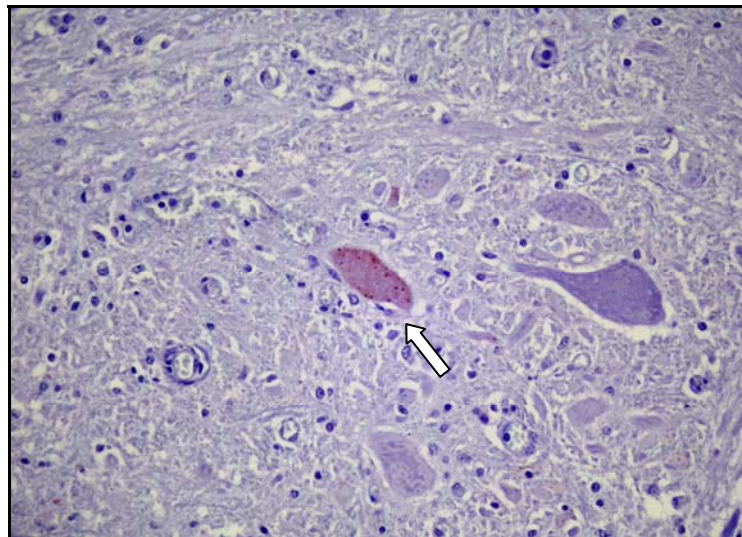


Figura 23 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Equino 3. Medula espinhal. Marcação positiva leve em neurônio (seta). Anticorpo policlonal Chemicon 1:1000. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 20.

4.3 Avaliação histopatológica e imunoistoquímica do SNC de herbívoros acometidos por raiva diagnosticados pelo SPV-UFRGS

4.3.1 Epidemiologia e sinais clínicos

De um total de 3.597 amostras de bovinos registrados no programa DXSNC do SPV-UFRGS entre 2002-2007 a raiva representou 0,83% dos casos. De 365 casos de doenças do Sistema Nervoso Central observados, a raiva representou 8,21% dos diagnósticos.

No presente estudo foram avaliados 30 animais da espécie bovina, sendo 12 machos, 13 fêmeas e 5 de sexo não informado, além de 2 animais da espécie equina, ambos com o sexo não informado pelo requisitante. A idade média apresentada pelos bovinos foi de 2,5 anos, tendo uma variação de 3 meses a 8 anos. Um equino tinha 4 anos de idade e o outro não foi informada a idade. As raças dos bovinos foram em ordem decrescente de ocorrência: Nelore (10/30), Mestiços (5/30), Holandês (2/30), Red Angus (1/30), Pardo-Suíço (1/30), Caracu (1/30) e 10 bovinos não tiveram a raça informada. Nos dois equinos do presente estudo não foi informada a raça dos animais.

A forma clínica predominante nos herbívoros deste estudo foi da raiva parálitica. Os sinais clínicos em bovinos caracterizaram-se principalmente por incoordenação dos membros (10/30), evoluindo para paresia e paralisia dos membros posteriores (7/30), decúbito esternal e posteriormente lateral (21/30). Outros sinais clínicos observados foram paresia/paralisia da cauda e diminuição do reflexo do ânus (2/30), diminuição do reflexo palpebral/pupilar (2/30), diminuição dos reflexos da língua (2/30), movimentos de pedalagem (4/30), opistótomo (4/30), salivação (6/30), tremores musculares (8/30), nistagmo (1/30), ataxia (1/30), depressão (1/30).

A média de evolução do quadro clínico foi de 4,5 dias, variando de 1 a 10 dias. Em quatro propriedades havia histórico de mordedura por morcegos nos animais e em duas propriedades, quatro bovinos haviam apresentado sintomatologia nervosa e morrido logo após. Dois bovinos apresentaram agressividade e mugidos, sugerindo tratar da forma furiosa da raiva. Um animal foi encontrado morto, não podendo ser analisado o quadro clínico e três bovinos não tiveram o histórico e dados clínicos informados.

4.3.2 Histopatologia de herbívoros com raiva

As lesões histopatológicas dos 30 casos analisados caracterizaram-se por meningoencefalite e meningiomielite não supurativa com infiltrado mononuclear perivascular, principalmente de linfócitos e em menor grau de plasmócitos e macrófagos, além de, microgliose, satelitose e neuronofagia. Presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (Corpúsculos de Negri) foi observado em 73,33% (22/30) dos bovinos, caracterizando-se na maioria dos casos por serem eosinofílicos, redondos a ovalados e únicos no citoplasma de neurônios, principalmente no citoplasma das células de Purkinje do cerebelo (figura 24). Em eqüinos observou-se corpúsculos de Negri em todos os casos.

Na técnica de imunohistoquímica para raiva foi realizada com o protocolo otimizado, utilizando-se anticorpo policlonal (anti-rabies polyclonal Chemicon #5199) na diluição de 1:1000, obteve-se 80% (24/30) dos casos de bovinos analisados positivos, com marcação nos corpúsculos de Negri e neurônios (figura 25) e 20% (6/30) não foram evidenciadas marcações. Na espécie eqüina obteve-se 100% de marcação positiva para raiva. Os controles positivo e negativo utilizados tiveram marcação positiva e negativa respectivamente. As marcações positivas nem sempre estavam próximas das lesões características de raiva.

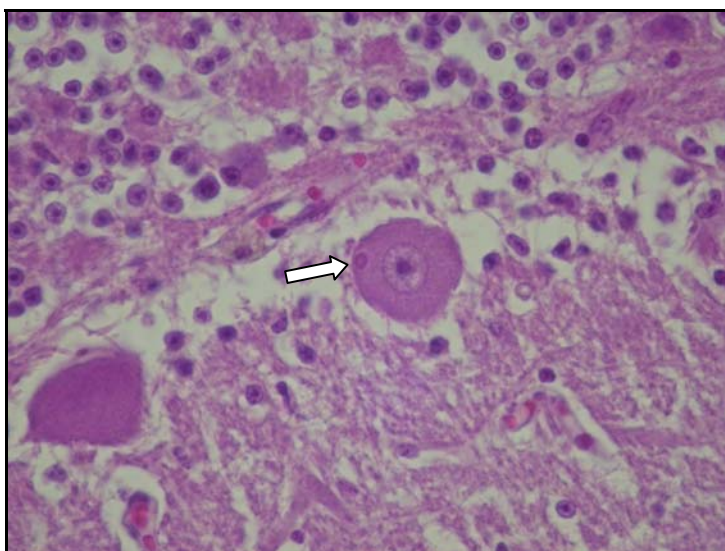


Figura 24 - Diagnóstico histológico e imunohistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Cerebelo. Presença de corpúsculo de inclusão viral em célula de Purkinje (seta). Coloração de HE, Obj. 40.

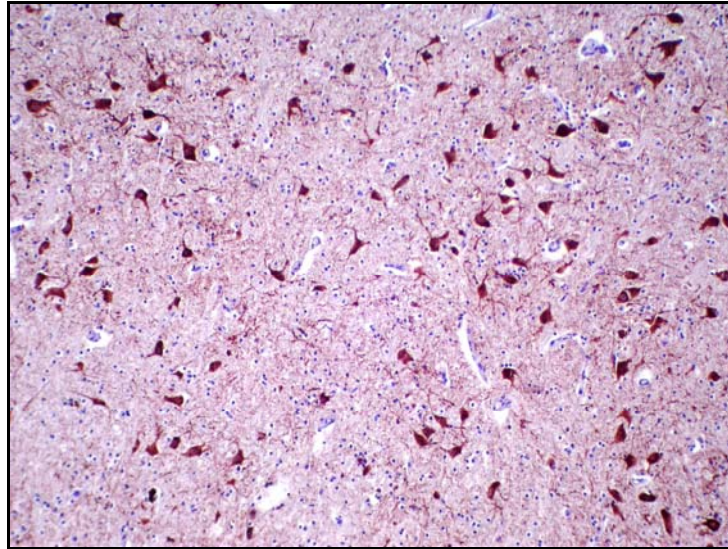


Figura 25 - Diagnóstico histológico e imunoistoquímico de raiva em herbívoros. Bovino. Grande quantidade de neurônios fortemente marcados. Imunoistoquímica. Método biotina-streptavidina-peroxidase. Obj. 4.

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico de raiva nos casos analisados neste estudo foi baseado no quadro clínico, lesões histopatológicas, exame de imunofluorescência direta em alguns casos e resultado positivo na técnica de imunistoquímica. As alterações histopatológicas observadas no presente estudo, caracterizadas por meningoencefalite e meningomielite não-suprativa com presença de manguitos perivasculares, microgliose, degeneração e necrose neuronal, satelitose, neuronofagia e vacuolização neuronal foram similares às descritas por outros autores (HERZOG, 1965; JUBB; HUXTABLE, 1993; JONES; HUNT; KING, 2000; LANGOHR *et al.*, 2003; RECH *et al.*, 2006). Neuronofagia juntamente com satelitose, gliose e presença de manguitos perivasculares mononucleares são marcas registradas da inflamação não-suprativa do sistema nervoso central em infecções virais neurotrópicas (RECH, 2007).

Inclusões em neurônios são, na maioria das vezes, características de doenças virais, sendo o corpúsculo de Negri o mais conhecido, característico de casos de raiva (PERL; GOOD, 1991; RECH, 2007). No entanto, apesar de característicos, nem sempre são visualizados (JONES; HUNT; KING, 2000). Essas inclusões podem estar no interior do corpo celular, ou podem ocorrer em dendritos, onde provavelmente assumem forma alongada, como a desses processos (JONES; HUNT; KING, 2000). Neste estudo os corpúsculos foram encontrados nos axônios, dendritos e corpos celulares de neurônios, mas principalmente no corpo celular. Essas inclusões eram observadas principalmente em neurônios normais, mas também eram observados em neurônios degenerados e em necrose. Em bovinos os corpúsculos de inclusão viral são observados principalmente nas células de Purkinje do cerebelo (SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995; JONES; HUNT; KING, 2000). Os principais locais com presença de corpúsculos de inclusão no mapeamento do sistema nervoso central de bovinos foram o gânglio trigêmeo com 100% e as células de Purkinje do cerebelo com 58,33% dos casos. Esses dois resultados confirmam resultados anteriores que mencionam a maior frequência de corpúsculos de inclusão nas células de Purkinje do cerebelo (LANGOHR *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2005) e também no gânglio trigêmeo (RECH *et al.*, 2006).

Na histologia das áreas do SNC mapeadas em 12 bovinos, foram observados corpúsculos de inclusão intracitoplasmático em 83,33% (10/12) dos casos analisados. Essa frequência é a mesma obtida em um estudo de 5 surtos e 2 casos isolados de bovinos entre 2002 e 2005 no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade

Federal de Santa Maria (RECH *et al.*, 2005). Nos casos do Programa DXSNC apresentaram uma frequência de 73,33% (22/30). Em outro estudo a frequência de corpúsculos de inclusão foi de 68% (LANGOHR *et al.*, 2003). Na Paraíba a frequência encontrada foi de 87% dos casos (LIMA *et al.*, 2005). Em estudo comparando as três técnicas de diagnóstico de raiva em bovinos e eqüinos, verificou-se que na espécie eqüina, somente em algumas oportunidades foi possível identificar pelo método histopatológico corpúsculos de Negri (PEIXOTO *et al.*, 2000). No entanto, nessa espécie observou-se uma frequência de corpúsculos em 100% dos casos analisados neste estudo. Essa frequência foi maior que a observada por Grenn *et al.* (1992) com 47%; por Lima *et al.* (2005) com 40%; por Peixoto *et al.* (2000) com 36,9%; e por Pierezan *et al.* (2007) que obteve 33,33% (1/3).

Diversos estudos relatam ausência de corpúsculos de inclusão em neurônios infectados pelo vírus rábico em até 30% dos casos (SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995; JONES; HUNT; KING, 2000). Isso provavelmente está relacionado com o estágio e curso da doença (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007) e a cepa de vírus circulante, pois certas cepas do vírus não produzem corpúsculos de Negri (JONES; HUNT; KING, 2000; LIMA *et al.*, 2005). Em estudo experimental realizado no Brasil com 20 bovinos inoculados com vírus rábico isolado de bovinos não foram encontrados corpúsculos intracitoplasmáticos pelos métodos histológicos (MACRUZ; NILSSON; CORTES, 1977). Os locais do SNC mais afetados na espécie bovina foram a medula espinhal, tronco encefálico, cerebelo e gânglio trigêmeo. O fato dessas lesões serem mais proeminentes nesses locais poderiam ser explicadas pela maneira de propagação centrípeta do vírus da raiva no SNC (SWANEPOEL, 2004).

Na otimização da técnica de imunistoquímica as cinco amostras de SNC foram fixadas em formol 10% por um período que variou de 24 horas a uma semana. É citado que a fixação prolongada prejudica principalmente a detecção de antígenos usando anticorpos monoclonais do que anticorpos policlonais (RAMOS-VARA *et al.*, 1999). A média de marcação nos 30 casos de bovinos registrados no programa DXSNC foi de 80%, porém esta média poderia ser maior se fossem utilizados outros cortes do SNC e o tempo de fixação no formol fosse menor, pois em muitos casos os materiais chegam ao Laboratório com mais de um mês de fixação e poucas regiões do SNC.

Foram utilizados lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath) para cortes do SNC, as quais atraem eletrostaticamente as secções de tecido incluídas em parafina, aderindo-as melhor a lâmina. Essas lâminas demonstraram ser melhores para utilização

da técnica já que em lâminas preparadas com gelatina e aquecidos em microondas e banho-maria na recuperação antigênica, os cortes em geral descolavam.

Foi possível observar que o anticorpo policlonal empregado apresentou marcação mais intensa que os anticorpos monoclonais. Este resultado difere do que já foi relatado por outros autores (HAMIR; MOSER, 1994; HAMIR *et al.*, 1995). Os anticorpos policlonais apresentam alta afinidade e ampla reatividade, mas baixa especificidade quando comparado com o anticorpos monoclonais (RAMOS-VARA, 2005). A utilização de anticorpos policlonais possibilita que uma maior quantidade de epítomos sejam marcados, uma vez que há uma grande variação na fonte de animais utilizados na produção de antígenos (MAANEN *et al.*, 2004).

A recuperação antigênica utilizando-se calor com solução tampão citrato previamente aquecida em banho-maria a 100⁰C possibilitou intensa marcação com o anticorpo policlonal. Diversos métodos de recuperação antigênica usando calor têm sido utilizados em IHQ como autoclave (BANKFALVI *et al.* 1994), panela de pressão (NORTON; JORDAN; YEOMANS, 1994; MILLER; ESTRAN, 1995), forno de microondas (GOWN; WEVER; BATTIFORA, 1993; CATTORETTI; SUURMEIJER, 1995; IMAM *et al.*, 1995) e banho-maria (KAWAI; SERIZAWA; TSUTSUMI, 1994), com o objetivo de quebrar as ligações cruzadas e expor os epítomos para o reconhecimento do anticorpo primário (PUCHTLER; MELOAN, 1985; ANTHONY; LEONG; GILHAM, 1989; SHI; COTE; TAYLOR, 1997). No presente estudo só foi usado banho-maria com a utilização de panela doméstica com água aquecida a 100⁰C, apresentando excelente resultado. Machado *et al.* (2004) obteve bons resultados com a técnica de imunoistoquímica para raiva utilizando calor com tampão citrato, porém usando forno de microondas seguido de digestão enzimática com tripsina 0,1%.

Corpúsculos de inclusão foram mais facilmente observados na técnica de imunoistoquímica quando comparados a coloração com HE. Presença de corpúsculos de inclusão viral foram observados na forma redonda ou oval, desde pequenos a grandes distribuídos no corpo celular, dendritos e axônios de neurônios. Marcação de antígeno viral pode ser observado na forma de agregados de grânulos pequenos distribuídos no citoplasma de neurônios. Dados similares já foram observados por outros autores (HAMIR; MOSER; RUPPRECHT, 1992; JOGAI; RADOTRA; BANERJEE, 2000; SHIN *et al.*, 2004;).

No mapeamento imunoistoquímico do SNC de bovinos e eqüinos foi possível ter marcação em todos os casos. Os melhores locais de marcação do antígeno da raiva em

bovinos foram na medula espinhal, tronco encefálico, cerebelo e gânglio trigêmeo. No caso do equino 3 somente foi possível confirmar o caso de raiva pela marcação de neurônios na imunistoquímica e exame histopatológico com presença de corpúsculos de inclusão na medula espinhal, pois na imunofluorescência direta o resultado foi negativo. Em trabalho de Silva *et al.* (1974), somente foi confirmada a presença do vírus da raiva na medula espinhal e bulbo de equinos na doença natural e sua ausência nas diferentes regiões do sistema nervoso central e outros tecidos. Deve-se portanto assim realizar a colheita de todo o SNC, para que vários segmentos sejam analisados e estudados para auxiliar no diagnóstico final.

A imunistoquímica é uma técnica laboratorial que utiliza anticorpos específicos para a visualização de quantidade, distribuição e localização celular de epítomos em cortes histológicos (HAINES; WEST, 2005). Neste estudo a imunistoquímica foi de suma importância para demonstrar o antígeno da raiva nos cortes seriados do sistema nervoso central de bovinos e equinos. Vários métodos têm sido descritos para detecção de antígenos da raiva em tecidos fixados em formol e emblocados em parafina (PALMER *et al.* 1985, BOURGON; CHARLTON, 1987; HAMIR; MOSER, 1994). A imunistoquímica é um método rápido, podendo ser usado na rotina em casos onde inicialmente há suspeita de raiva (MACHADO; SILVA; NUNES, 2004), especialmente em casos onde fragmentos de cérebro submetidos ao laboratório foram fixados em formol, impossibilitando a realização da imunofluorescência direta. Autores relatam a observação de casos de raiva em que fragmentos de cérebro apresentavam-se em processo de autólise e mesmo assim o antígeno da raiva foi detectado por imunistoquímica (ARSLAN; SAGLAM; TEMUR, 2004). Adicionalmente o uso do teste de imunistoquímica em tecidos fixados em formol facilita o transporte da amostra até o laboratório, uma vez que não se faz necessário o acondicionamento da mesma em sacos plásticos juntamente com gelo gerando um tempo hábil de envio da amostra ao laboratório (HAMIR; MOSER, 1994). A imunistoquímica pode ser também usada, particularmente em estudos retrospectivos, quando tecidos frescos ou congelados não podem ser avaliados ou quando as amostras não podem ser enviadas ao laboratório imediatamente, nesses casos, o uso da imunistoquímica pode ser aplicado (ARSLAN; SAGLAM; TEMUR, 2004).

Estudos feitos com materiais deteriorados comprovaram que o primeiro exame que resulta em falso negativo é a detecção dos corpúsculos de Negri, seguido pela

inoculação em camundongos e, por último, a imunofluorescência direta (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

Os resultados do presente trabalho demonstram que a técnica de imunistoquímica para raiva utilizando-se anticorpo primário policlonal Chemicon #5199 apresentou excelentes resultados quando tratados com solução de tampão citrato e calor na recuperação antigênica. Proporcionou também economia de tempo, pois com os dois anticorpos monoclonais e recuperação antigênica com protease XIV e proteinase K necessitou-se deixar em “overnight”, aumentando o tempo para finalizar o diagnóstico.

É uma ferramenta importante de diagnóstico de rotina laboratorial, especialmente quando o SNC é submetido fixado em formol 10%, impossibilitando a realização de provas de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos, além de, solucionar casos de meningoencefalite não-específica sem a presença de corpúsculos de inclusão, auxiliando o programa DXSNC do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

6. CONCLUSÕES

- 1.** Na histologia de cortes seriados de bovinos com raiva, a frequência de corpúsculos de inclusão viral são observados com maior frequência em neurônios do gânglio trigêmeo (100%) e células de Purkinje do cerebelo (58,33%).
- 2.** Na espécie bovina as melhores áreas do SNC para a utilização da técnica de imunistoquímica são a medula espinhal, região do tronco encefálico, cerebelo e gânglio trigêmeo.
- 3.** O anticorpo policlonal proporcionou melhor marcação do que os monoclonais.
- 4.** A recuperação antigênica com o uso de calor (tampão citrato) em banho-maria a 100⁰C em panela de aço inox é um método eficiente e econômico para implantar em laboratórios de diagnóstico veterinário.
- 5.** A técnica de imunistoquímica permite identificar maior quantidade de corpúsculos de inclusão viral do que a histologia e permite identificar antígeno viral principalmente na forma de agregados de grânulos.
- 6.** A técnica de imunistoquímica permite o diagnóstico de raiva a partir de materiais que são enviados conservados em formol 10% nos quais não é possível realizar o exame de imunofluorescência direta para raiva e também por contribuir em estudos retrospectivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTHONY, S.; LEONG, Y.; GILHAM, P. N. The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. **Pathology**, v. 21, p. 266-268, 1989.
- ARSLAN, A.; SAGLAM, Y. S.; TEMUR, A. Detection of rabies viral antigens in non-autolysed and autolysed tissues by using an immunoperoxidase technique. **The Veterinary Record**, v. 155, p. 550-552, 2004.
- BAGÓ, Z.; REVILLA-FERNANDEZ, S.; ALLERBERGER, F. Value of immunohistochemistry for rapid ante mortem rabies diagnosis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 9, p. 351-352, 2005.
- BANKFALVI, A. *et al.* Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. **The Journal of Pathology**, v. 174, p. 223-228, 1994.
- BARNARD, B. J. H.; VOGES, S. F. A simple technique for the rapid diagnosis of rabies in formalin-preserved brain. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 49, p. 193-194, 1982.
- BARROS, C. S. L. Encefalomyelites virais dos Equinos. In: RIET-CORREA, F. *et al.* **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. v. 1, 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. p.103-106.
- BARROS, C. S. L. *et al.* **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. Monte Claros: Vallée, 2006. 207p.
- BAUER, A. G. Possibilidade do diagnóstico “in vivo” da raiva, pelo exame das fossas nasais. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v. 3, p. 125-131, 1975.
- BOURGON, A. R.; CHARLTON, K. M. The demonstration of rabies antigen in paraffin-embedded tissues using the peroxidase-antiperoxidase method: a comparative study. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 117-120, 1987.
- BRONNERT, J. B. *et al.* Organ transplantations and rabies transmission. **Journal of Travel Medicine**, v.14, p. 177-180, 2007.

- BURTON, E. C. *et al.* Rabies encephalomyelitis. **Archives of Neurology**, v. 62, p. 873-882, 2005.
- CATTORETTI, G.; SUURMEIJER, A. J. H. Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin-embedded tissues using microwaves: A review. **Advances in Anatomy Pathology**, v. 2, p. 2-9, 1995.
- CHARLTON, K. M. Rabies: Spongiform lesions in the brain. **Acta Neuropathologica**, v. 63, p. 198-202, 1984.
- CHARLTON, K. M. *et al.* Experimental rabies in skunks and foxes. Pathogenesis of the spongiform lesions. **Laboratory Investigation**, v. 57, p. 634-645, 1987.
- CHARLTON, K. M. *et al.* The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at the site of exposure. **Acta Neuropathologica**, v. 94, p. 73-77, 1997.
- CONSALES, C. A.; BOLZAN, V. L. Rabies review: immunopathology, clinical aspects and treatment. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 13, p. 5-38, 2007.
- CÔRTEZ, J. A.; NILSSON, M. R.; VASCONCELLOS, S. A. Estudo comparativo da sensibilidade das técnicas de imunofluorescência direta, aplicada a decalques de cornea e de inoculação intracerebral em camundongos, a partir d asaliva, para o diagnóstico precoce da raiva em bovinos. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**. v. 15, p. 143-150, 1978.
- CÔRTEZ, V. A.; PAIM, G. V.; OLIVEIRA, M. C. G. Diagnóstico da raiva canina. **Revista de Saúde Pública**, v. 13, p. 353-356, 1979.
- CREPIN, P. *et al.* Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1117-1121, 1998.
- FERNANDES, C. G.; RIET-CORREA, F. Raiva. In: RIET-CORREA, F. *et al.* **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. v. 1. 3 ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. p.184-198.
- FOLEY, G. L.; ZACHARY, J. F. Rabies-induced spongiform change and encephalitis in a heifer. **Veterinary Pathology**, v. 32, p. 309-311, 1995.

FUNASA, FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle.** Brasília: Gráfica e Editora Brasil, 1996,117p.

GEORGE, L. W. Moléstias do sistema nervoso. In: SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais.** v. 2. 1 ed. São Paulo: Manole, 1993. p. 901-1039.

GERMANO, P. M. L. Avanços na pesquisa da raiva. **Revista de Saúde Pública,** v. 28, p. 86-91, 1994.

GERMANO, P. M. L.; MIGUEL, O.; CHAMELET, E. L. B. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos, aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo,** v. 14, p. 133-141, 1977.

GOWN, A. M.; WEVER, N.; BATTIFORA, H. Microwave-based antigenic unmasking. **Applied Immunohistochemistry,** v. 1, p. 256-266, 1993.

GREEN, S. L. *et al.* Rabies in horses: 21 cases (1970-1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association,** v. 200, p. 1133-1137, 1992.

HAINES, D. M.; WEST, K. H. Immunohistochemistry: Forging the links between immunology and pathology. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 108, p. 151-156, 2005.

HAMIR, A. N.; MOSER, G.; RUPPRECHT, C. E. Morphologic and immunoperoxidase study of neurologic lesions in naturally acquired rabies of raccoons. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,** v. 4, p. 369-373, 1992.

HAMIR, A. N.; MOSER, G. Immunoperoxidase test for rabies: utility as a diagnostic test. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,** v. 6, p. 148-152, 1994.

HAMIR, A. N. *et al.* Immunohistochemical test for rabies: identification of a diagnostically superior monoclonal antibody. **The Veterinary Record,** v. 136, p. 295-296, 1995.

- HAMIR, A. N. *et al.* Use of a single anti-nucleocapsid monoclonal antibody to detect rabies antigen in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **The Veterinary Record**, v. 138, p. 114-115, 1996.
- HERZOG, E. Histologic diagnosis of rabies. **Archives of Pathology**, v. 39, p. 279-280, 1965.
- HUDSON, L. C. *et al.* Clinical features of experimentally induced rabies in cattle and sheep. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 43, p. 85-95, 1996.
- IMAM, S.A. *et al.* Comparison of two microwave based antigen-retrieval solutions in unmasking epitopes in formalin-fixed tissue for immunostaining. **Anticancer Research**, v. 15, p. 1153-1158, 1995.
- JACKSON, A. C.; REIMER, D. L. Pathogenesis of experimental rabies in mice: an immunohistochemical study. **Acta Neuropathologica**, v. 78, p. 159-165.
- JOGAI, S.; RADOTRA, B. D.; BANERJEE, A. K. Immunohistochemical study of human rabies. **Neuropathology**, v. 20, p. 197-203, 2000.
- JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N.W. **Patologia veterinária**. 6. ed. Barueri: Manole. 2000, 1415p.
- JUBB, K. V. F.; HUXTABLE, C. R. The nervous system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4th. v. 1. San Diego: Academic Press, 1993. cap. 3, p. 267-437.
- KAWAI, A.; SERIZAWA, A.; TSUTSUMI, Y. Heat-induced antigen retrieval of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. **Pathology International**, v. 44, p. 759-764, 1994.
- LANGOHR, I.M. *et al.* Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. **Ciência Rural**, v. 33, p. 125-131, 2003.
- LIEBERMANN, H. Infecções por Rabdovírus. In: BEER, J. **Doenças Infeciosas em animais domésticos**. 1 ed. v.2. São Paulo: Roca, 1999. cap. 10, p.167-179.

- LIMA, E. F. *et al.* Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 250-264, 2005.
- LÓPEZ, J.W. *et al.* Immunohistochemical recognition of a wide spectrum of Lyssaviruses in formalin-fixed tissues by one monoclonal antibody. **Boletim Centro Panamericano Fiebre Aftosa**, v. 64-67, p. 18-25, 1998-2001.
- MAANEN, C. *et al.* Na interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 351-364, 2004.
- MACHADO, G. F.; SILVA, L. H. Q.; NUNES, C. M. Detecção de antígenos do vírus da raiva em encéfalos de cão mantido em formol durante longo período. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, p. 89-92, 2004.
- MACRUZ, R.; NILSSON, M. R.; CORTES, J. A. Raiva experimental em bovinos. Histopatologia do sistema nervoso central. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 14, p. 123-127, 1977.
- MARTELL, M. A. *et al.* Experimental bovine paralytic rabies—"derriengue". **The Veterinary Record**, v. 95, p. 527-530, 1974.
- MARTÍNEZ-BURNES, J. *et al.* An outbreak of vampire bat-transmitted rabies in cattle in northeastern Mexico. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 38, p. 175-177, 1997.
- MCCOLL, K. A. *et al.* Polymerase chain reaction and other laboratory techniques in the diagnosis of long incubation rabies in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 70, p. 84-89, 1993.
- MILLER, R. T.; ESTRAN, C. Heat-induced epitope retrieval with a pressure cooker—suggestions for optimal use. **Applied Immunohistochemistry**, v. 3, p. 190-193, 1995.
- MIRANDA, A. O. *et al.* Confirmación del virus rábico transmitido por murciélagos en bovinos del nordeste argentino mediante seroneutralización en ratón. **Revista Veterinaria**, v. 16, p. 36-39, 2005.

- MOREIRA, E. C.; REIS, R. Pesquisa do vírus da raiva no humor aquoso, saliva, glândula salivar submandibular e córnea de bezerros inoculados experimentalmente. **Arquivo da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 27, p. 329-334, 1975.
- MORI, A. E.; LEMOS, R. A. A.; KADRI, A. Raiva. In: LEMOS, R. A. A. **Botulismo, meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 5, polioencefalomalacia, raiva**. Campo Grande: Editora UFMS, 2004, p. 63-86.
- NAGARAJ, T. *et al.* Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: Comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. **Journal of Clinical Virology**, v. 36, p. 17-23, 2006.
- NORTON, A. J.; JORDAN, S.; YEOMANS, P. Brief, high temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. **The Journal of Pathology**, v. 173, p. 371-379, 1994.
- PALMER, D. G. *et al.* Demonstration of rabies viral antigen in paraffin tissue sections: Comparison of the immunofluorescence technique with the unlabeled antibody enzyme method. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, p. 283-286, 1985.
- PEIXOTO, Z. M. P. *et al.* Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, 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. **The natural history of rabies**. 2th. Boston: Boca Raton, 1991. cap. 8, p. 164-188.
- PIEREZAN, F. *et al.* Raiva em eqüinos. In: XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2007, Campo Grande. **Anais**. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2007, p.145-146.
- PROPHET, E. B. *et al.* **AFIP laboratory methods in histotechnology**. Washington: American Registry of Pathology, 1994. 274 p.
- PUCHTLER, H.; MELOAN, S.N. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. **Histochemistry**, v. 82, p. 201-204, 1985.

QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005

RADOSTITS, O. M. *et al.* **Clínica veterinária**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

RAMOS-VARA, J. A. *et al.* Diagnosing infectious porcine diseases using immunohistochemistry. **Swine and Health production**, v. 7, p. 85-91, 1999.

RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 405-426, 2005.

RECH, R. R. **Alterações no encéfalo de bovinos submetidos à vigilância das encefalopatias espongiformes transmissíveis**. 2007. 228 f. Tese de doutorado- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

RECH, R. R. *et al.* Raiva em herbívoros: 27 casos. Encontro Nacional de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário, 2006, Campo Grande. **Anais**. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2005, p. 43-44.

RECH, R. R. *et al.* Histomorfologia do gânglio de Gasser, da rete mirabile carotídea e da hipófise de bovinos: estudo de 199 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 105-111, 2006.

REIS, R. *et al.* Presença do vírus rábico na córnea, humor aquoso e nervo óptico de humanos, bovinos, felinos e caninos com raiva. **Arquivo da Escola de Veterinária**, v. 23, p. 207-214, 1971.

REIS, M. C. *et al.* Aspectos clínicos e epidemiológicos da raiva bovina apresentados na casuística da clínica de bovinos (Oliveira dos Campinhos, Santo Amaro, Bahia), Universidade Federal da Bahia, durante o período de janeiro de 1990 a dezembro de 1999 (relato de caso). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 4, p. 12-17, 2003.

RIET-CORREA, F. *et al.* Relatório de atividades e doenças da área de influência no período 1978-1982. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico**, v. 4, p. 21-24, 1983.

- RIET-CORREA, F.; RIET-CORREA, G.; SCHILD, A. L. Importância do exame clínico para o diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso em ruminantes e eqüídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, p. 161-168, 2002.
- RONDON, E. S. *et al.* Estudo comparativo da sintomatologia clínica de bovinos suspeitos de raiva. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, p. 253-256, 1995.
- SANCHES, A. W. D. *et al.* Doenças do sistema nervosa central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 113-118, 2000.
- SCHNEIDER, L. G. The cornea test; a new method for the intra-vitam diagnosis of rabies. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 16, p. 24-31, 1969.
- SHERMAN, J.; SCHAAL, E. Localized diseases of the bovine brain and spinal-cord. **The Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**, v.3, p. 179-191, 1987.
- SHI, S.; COTE, R.J.; TAYLOR, C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 45, p. 327-343, 1997.
- SHIN, T. *et al.* Immunohistochemical localization of endothelial and inducible nitric oxide synthase within neurons of cattle with rabies. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66. p. 539-541, 2004.
- SILVA, R. A. Evolução histórica da raiva. **Instituto Pasteur**. Disponível em: <www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/anais/seminario_internacional/resumo.shtm>. Acesso em 25 nov. 2008.
- SILVA, J. A. *et al.* Uso da terra como determinante da distribuição da raiva bovina em Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 273-283, 2001.
- 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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 9, p. 29-31, 1974.

- SRINIVASAN, A. *et al.* Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1103-1111, 2005.
- STEELE, J. H.; FERNANDEZ, P. J. History of rabies and global aspects. In: BAER, G. M. (Ed.) **The natural history of rabies**. 2th. Boston: Boca Raton, 1991. cap. 8, p. 1-27.
- SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; LAHUNTA, A. **Veterinary neuropathology**. Baltimore: Mosby, 1995. 527p.
- SWANEPOEL, R. Rabies. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. **Infections diseases of livestock**. 2th. vol. 2. Cape Town: Oxford University Press, 2004. cap. 99, p. 1123-1182.
- TABEL, H.; CHARLTON, K.M., *et al.* The diagnosis of rabies in a horse by brain neutralization test. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 38, p.344-345, 1974.
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 310p.
- VURAL, S. A.; ALCIGIR, G.; BERKIN, S. Immunohistochemical and histopathological studies of fixed rabies virus in goats. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 83-89, 2001.
- WOLDEHIWET, Z. Rabies: recent developments. **Research in Veterinary Science**, v. 73, p. 17-25, 2002.
- WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. **Clinica Chimica Acta**, v. 351, p. 49-63, 2005.
- ZACHARY, J. F. Nervous System, In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathologic Basis Veterinary Disease**. 4th. St. Louis: Mosby, 2007. cap. 14, p. 833-971.
- ZIMMER, K. *et al.* Evaluation of five different methods for routine diagnosis of rabies. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 37, p. 392-400, 1990.