

Este trabalho teve como objetivos utilizar a imunocitoquímica (ICQ) como método rápido de diagnóstico para raiva, e realizar estudo retrospectivo de casos positivos de raiva nos arquivos do Laboratório de Patologia Animal (LAPA/CAV), através da imunohistoquímica (IHQ). A IHQ foi essencial para a conclusão do diagnóstico nos casos do estudo retrospectivo, especialmente aqueles em que não foram observadas inclusões de Negri. A ICQ foi positiva em 85,7% dos bovinos com raiva, além de se mostrar um teste rápido e de fácil execução. Técnicas que buscam o diagnóstico rápido são extremamente importantes, pois permitem que medidas de prevenção e controle possam ser tomadas mais rapidamente.

Orientador: Sandra Davi Traverso

Coorientador: Aldo Gava

Lages, 2014



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IMUNOCITOQUIMICA NO
DIAGNÓSTICO DE RAIVA EM
BOVINOS E ESTUDO
RETROSPECTIVO**

CLAUDIA SALETE WISSER

LAGES, 2014

CLAUDIA SALETE WISSER

**IMUNOCITOQUIMICA NO DIAGNÓSTICO DE RAIVA EM
BOVINOS E ESTUDO RETROSPECTIVO**

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

Orientadora: Sandra Davi Traverso

**LAGES
2014**

CLAUDIA SALETE WISSER

IMUNOCITOQUIMICA NO DIAGNÓSTICO DE RAIVA EM BOVINOS E ESTUDO RETROSPECTIVO

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

Banca Examinadora

Orientadora: _____

Dr^a Sandra Davi Traverso
CAV/UEDESC

Coorientador _____

Dr. Aldo Gava
CAV/UEDESC

Membro: _____

Dr. David Driemeier
SPV/UFRGS

Membro: _____

Dr. José Cristani
CAV/UEDESC

Lages, 25/02/2014

DEDICO

A Deus, por mais esse sonho alcançado.
A minha família pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTO

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

Ao meu pai Siegfried, pelo exemplo de vida, de fé e de dedicação.

A minha mãe Vera, que ao lado de Deus esteve me abençoando todo tempo.

Ao meu irmão Claudinei pelo apoio e incentivo.

A toda minha família, meu obrigada e amo vocês!

Ao meu noivo Adriano, por todo amor, carinho e principalmente paciência ao longo dessa jornada. Obrigada por estar sempre ao meu lado, te amo!

A minha orientadora, prof^a Sandra, uma mãezona. Obrigada pelas dicas, conselhos e pela amizade.

Ao meu coorientador prof. Aldo Gava, pelo exemplo profissional.

As minhas amigas e colegas Vanessa, Tiffany e Claudia Pies pelas dicas, conselhos, risadas e pela companhia.

Aos colegas de pós-graduação: Wagner, Francine, Nathalia Wicpolt, Natalha Biondo, Claudinha, Luciane, Fernanda, Talitha, Leise, Cecília, Camila.

Aos bolsistas do laboratório, em especial aos que trabalharam diretamente neste projeto.

Ao professor André Thaler, pelo auxílio na estatística.

Ao laboratório de virologia da UFSM prof. Eduardo Flores e Fábio, pelo auxílio na realização da IFD.

A UDESC, pelo conhecimento e oportunidade concedida.

Ao laboratório de patologia animal, professores, funcionários, bolsistas e estagiários, por todo conhecimento adquirido, amizade e alegrias vividas juntos.

Ao FUMDES pela concessão da bolsa de mestrado, importante para auxílio à pesquisa.

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

Muito Obrigada!

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

(Chico Xavier)

RESUMO

WISSER, Claudia Salet. **Imunocitoquímica no diagnóstico de raiva em bovinos e estudo retrospectivo**, 2014, 44 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Patologia Animal) Universidade do Estado de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

Este trabalho teve como objetivos utilizar a imunocitoquímica (ICQ) como método rápido de diagnóstico para raiva, e realizar estudo retrospectivo de casos positivos de raiva nos arquivos do Laboratório de Patologia Animal (LAPA/CAV), através da imunohistoquímica (IHQ). O estudo foi dividido em duas etapas, levantamento de dados entre os anos de 1987 e 2011 no LAPA/CAV, através de processamento das amostras mantidas em parafina, para histopatologia e imunohistoquímica (IHQ), e acompanhamento clínico de animais suspeitos entre os anos de 2012 e 2013, no qual bovinos mortos naturalmente ou eutanasiados foram necropsiados. Amostras de sistema nervoso central foram coletadas para aplicação de ICQ, além de imunofluorescência direta e histopatologia com coloração de Hematoxilina e Eosina. No estudo retrospectivo observou-se que a idade dos animais afetados variou de quatro meses a 10 anos. Os principais sinais clínicos relatados foram incoordenação dos membros posteriores, evoluindo para decúbito e morte em 2 a 7 dias. As regiões do vale e leste de Santa Catarina foram às com maior número de casos remetidos ao laboratório. Durante o acompanhamento clínico 13 animais apresentaram a forma paralítica da doença e um bovino apresentou forma furiosa. As alterações histológicas observadas, nas duas etapas do trabalho consistiram em meningonecefalite linfocítica e macrofágica perivascular, variando de leve a acentuada, por vezes com focos de gliose e necrose neuronal; Corpúsculos de inclusão de Negri foram observados em 85% dos casos do levantamento e 88% dos animais acompanhados clinicamente. A IHQ foi essencial para a conclusão do diagnóstico nos casos do estudo retrospectivo, especialmente aqueles em que não foram observadas inclusões de Negri. A ICQ foi positiva em 85,7% (12/14) dos bovinos com raiva, inclusive em um animal cuja IFD foi negativa, além de se mostrar um teste rápido e de fácil execução. Técnicas que buscam o diagnóstico rápido são extremamente importantes, pois permitem que medidas de prevenção e controle possam ser tomadas mais rapidamente.

Palavras-chave: raiva, encefalite, imunocitoquímica, diagnóstico rápido;

ABSTRACT

WISSER, Claudia Salete. **Immunocytochemistry in the diagnosis of cattle rabies and a retrospective study**, 2014, 44 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Patologia Animal) Universidade do Estado de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

This study aimed to investigate the use of immunocytochemistry (ICC) as a quick diagnostic method of rabies, and to perform a retrospective study of positive rabies cases of the Animal Pathology Laboratory (LAPA/CAV) archives, by using immunohistochemistry (IHC). The study was divided into two stages: data collection from the LAPA/CAV archives between 1987 and 2011, through the processing of paraffin embedded samples for histopathology and IHC; and clinical follow-up of susceptible animals between the years of 2012 and 2013, in which naturally dead or euthanized animals were necropsied. Central nervous system samples were collected for immunocytochemistry assessment, in addition to direct immunofluorescence (DIF) and histopathology with hematoxylin and eosin staining. The retrospective study showed that the affected animals' ages ranged from 4 months to 10 years. Most frequently reported clinical signs were incoordination of the hind limbs, progressing to decumbency and death in 2-7 days. Northeastern (Vale do Itajaí) and eastern Santa Catarina were the regions with most of the cases submitted to the laboratory. During the clinical follow-up stage 13 animals presented the paralytic form of the disease, and one showed the furious form. The histological alterations observed in both stages of the study consisted of mild to severe perivascular lymphocytic and macrophagic meningoencephalitis, sometimes with foci of gliosis and neuronal necrosis; Negri inclusion bodies were observed in 85% of the retrospective study cases and 88% of the clinically assessed animals. IHC was essential to the diagnosis conclusion in the retrospective study, especially those in which no Negri bodies were found. The ICC was positive in 85,7% (12/14) of the cases, including one animal whose direct immunofluorescence was negative, and also proved to be a fast and easy-to-perform test. Rapid diagnostic techniques are extremely important as they allow for prevention and control measures to be taken quickly.

Key-Words: rabies, encephalitis, immunocytochemistry, rapid diagnosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Sinais clínicos de bovinos infectados pelo vírus da raiva. Salivação excessiva.....	28
Figura 2. Sinais clínicos de bovinos infectados pelo vírus da raiva. Paralisia de membros posteriores.....	28
Figura 3. Sinais clínicos de bovinos infectados pelo vírus da raiva. Opstótono.....	29
Figura 4. Lesões macroscópicas de bovinos infectados pelo vírus da raiva. Hiperemia das leptomeninges.....	29
Figura 5. Lesões histológicas no sistema nervoso de bovinos infectados pelo vírus da raiva. Corpúsculos de inclusão de Negri no citoplasma de neurônio de purkinje (H.E., Obj 40x).	30
Figura 6. Lesões histológicas no sistema nervoso de bovinos infectados pelo vírus da raiva. Infiltrado de linfócitos e macrófagos perivascular acentuado (H.E., Obj 40x).....	31
Figura 7. Diagnóstico imunocitoquímico em sistema nervoso de bovino infectado pelo vírus da raiva. Marcação imunopositiva no pericário e axônio de neurônios (ICQ, Obj 40x).....	33
Figura 8. Diagnóstico por imunofluorêscência direta. Marcação positiva	33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Levantamento de dados LAPA/CAV/UDESC. Numero de casos testados e positivos para raiva em bovinos. 24
- Tabela 2. Acompanhamento clínico de animais com raiva. Propriedades visitadas entre os anos de 2012 e 2013. Numero total de animais na propriedade, doentes, mortos, necropsiados e mortalidade... 27

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Estudo retrospectivo. Regiões do Estado de Santa Catarina com maior número de casos de raiva remetidos ao LAPA/CAV entre 1987 e 2011.....	25
--	----

LISTA DE ABREVIACÕES

IFD – Imunofluorecncia direta

IIC – Inoculação intracerebral em camundongo

IHQ – Imunohistoquímica

ICQ – Imunocitoquímica

SNC – Sistema nervoso central

MN – Morte Natural

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 A RAIVA	16
2.8 DIAGNÓSTICO DE RAIVA	18
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 LEVANTAMENTO DE CASOS DE RAIVA NO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA ANIMAL CAV/UEDESC.....	22
3.2 ACOMPANHAMENTO CLÍNICO, NECROPSIA E APLICAÇÃO DA IMUNOCITOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DE BOVINOS INFECTADOS PELO VÍRUS DA RAIVA.....	22
3.2.1 Processamento das amostras e aplicação da imunocitoquímica.....	23
4 RESULTADOS.....	24
4.1 LEVANTAMENTO DE CASOS DE RAIVA NO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA ANIMAL CAV/UEDESC.....	24
4.1 ACOMPANHAMENTO CLÍNICO DE ANIMAIS SUSPEITOS DE INFECCÃO PELO VÍRUS DA RAIVA.	25
4.1.1 Epidemiologia, sinais clínicos e lesões macroscópicas.....	25

4.1.2 Lesões histológicas.....	30
4.1.3 Aplicação da imunocitoquímica no diagnóstico de raiva.	31
5 DISCUSSÃO.....	34
6 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO I.....	42

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa, de notificação obrigatória, causada por um RNA vírus do gênero *Lyssavirus* que acomete o SNC de várias espécies, inclusive o homem (BARROS et al., 2006; JONES; HUNT; KING, 2000).

A imunofluorescência direta (IFD) realizada em amostras de sistema nervoso resfriado ou congelado é o teste padrão ouro para o diagnóstico (WHO, 2013), todavia com o passar dos anos novas técnicas vem sendo desenvolvidas buscando alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico da doença. Entre estas técnicas estão incluídos testes sorológicos, moleculares e imunológicos (WOLDEHIWET, 2005).

A imunohistoquímica (IHQ) vem sendo utilizada, demonstrando bons resultados no diagnóstico de raiva (ACHKAR et al, 2010; STEIN et al, 2013). Através dela podem ser realizados estudos retrospectivos, além de concluir o diagnóstico especialmente nas situações em que a conservação sobre refrigeração não é possível, inviabilizando o exame de IFD (PEDROSO et al, 2008). Entretanto o tempo para o diagnóstico através dela é relativamente maior se comparado a IFD (ABREU, 2012).

Com base nisso, recentemente vem sendo desenvolvidos protocolos alternativos, buscando rapidez e facilidade na execução dos testes. No Brasil, Abreu (2012) desenvolveu protocolo de processamento em micro-ondas para o diagnóstico histopatológico e imunohistoquímico rápido da doença. Na Índia, África, Afeganistão e Iraque vêm sendo descrita a utilização da imunohistoquímica em esfregaços de sistema nervoso central de humanos e animais suspeitos de raiva, tornando o diagnóstico prático e ainda mais rápido (LEMBO et al, 2006; MADHUSUDANA et al, 2012). Ambos os trabalhos demonstraram correlação de 100% em relação ao método oficial (IFD).

O estudo foi dividido em duas etapas, estudo retrospectivo dos casos de raiva diagnosticados no Laboratório de Patologia Animal LAPA/CAV, entre os anos de 1987 e 2011, e acompanhamento clínico de animais suspeitos entre os anos de 2012 e 2013. O objetivo foi aplicar a imunocitoquímica como método rápido de diagnóstico para a doença, e relacionar casos positivos para raiva no LAPA/CAV, com o auxílio da imunohistoquímica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A RAIVA

A raiva é uma das doenças mais antigas e conhecidas da humanidade, com os primeiros registros a pelo menos 4 mil anos. O vírus da raiva (RabV) pertence à família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*. O genoma viral é formado por uma cadeia de RNA fita simples, disposto em formato de mola, recoberto por uma nucleoproteína (RODRIGUEZ et al, 2007).

O vírus da raiva é mantido na natureza através de ciclos inter-relacionados, denominados de ciclos urbano, silvestre, rural e aéreo. O ciclo urbano está relacionado à ocorrência de raiva em cães e gatos domésticos, o ciclo rural engloba a raiva em herbívoros, como bovinos e equinos; o termo silvestre é utilizado para nomear a raiva ocorrida em animais silvestres, como raposas, guaxinins, gambás e primatas; e o aéreo refere-se à raiva entre os morcegos, hematófagos ou não (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

No ciclo silvestre as espécies reservatórias do vírus podem variar em função da geografia. Na América Latina, os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* são hospedeiros e em função de seus hábitos alimentares, os principais transmissores da infecção aos bovinos (RODRIGUEZ et al, 2007). No ciclo urbano, os principais vetores são os caninos (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007), sendo esses a espécie com maior frequência de transmissão aos humanos no Brasil, seguido de morcegos, primatas não humanos, felinos e herbívoros. Este último por manipulação direta da saliva de animais infectados (WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011).

Em varias regiões do Brasil o ciclo urbano vem sendo controlado através de vacinação dos animais de companhia. Todavia os ciclos silvestres estão em expansão, com maior número de casos registrados (WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011). Em Santa Catarina, o último caso de raiva humana ocorreu em 1981, e os últimos registros de raiva urbana ocorreram em 2006, em dois cães e um gato, por envolvimento com morcegos. No entanto casos de raiva em animais de produção são registrados rotineiramente (DIVE/SC, 2012).

A infecção pelo vírus da raiva ocorre na maioria das vezes por transmissão percutânea, através da mordedura de animais infectados

(RODRIGUEZ et al, 2007; BARROS et al, 2006; RADOSTITS et al, 2002). Após a entrada no organismo o vírus pode fazer uma replicação primária no sítio de inoculação, ou entrar diretamente nos terminais nervosos (ZACHARY, 2009). A partir daí o vírus invade os neurônios motores e sensoriais e progride por fluxo axonal retrógrado até o sistema nervoso central

Após atingir o sistema nervoso central, a disseminação viral é rápida (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Ela pode ocorrer tanto por fluxos axoplasmáticos anterógrados ou retrógrados e também por disseminação neurônio-neurônio (ZACHARY, 2009). Dessa maneira atinge vários órgãos, incluindo as glândulas salivares, onde se replica e é eliminado na saliva (BARROS et al, 2006), durante alguns dias antes mesmo do aparecimento dos sinais clínicos (MAXIE; YOUSSEF, 2006).

O período médio de incubação experimental em bovinos é de 15 dias. Nos casos de ocorrência natural, esse período é de em média três semanas, mas pode variar de duas semanas a vários meses. (RADOSTITS et al, 2002).

Os sinais clínicos podem variar em função da localização das lesões no sistema nervoso e cursar com duas formas de apresentação: a furiosa ou a paralítica. Em bovinos no Brasil, predomina a forma clínica paralítica (BARROS et al, 2006). Os primeiros sinais são de incoordenação dos membros pélvicos, que evoluem para paralisia flácida, inicialmente de membros posteriores, após anteriores, seguida de decúbito esternal e lateral. A morte geralmente ocorre 48 horas após o decúbito, depois de um curso de seis a sete dias (RADOSTITS et al, 2002). Podem ser observados ainda: relaxamento de esfíncter anal, ausência de reflexo anal, paralisia de cauda, tremores de cabeça, opstótono, bruxismo, salivação, fezes ressequidas e escassas, retenção ou incontinência urinária (BARROS et al, 2006). A forma furiosa é relatada eventualmente (LANGOHR et al, 2003), e nesse caso o animal fica em estado de alerta, apresenta hiperexcitabilidade, mugidos constantes, agressividade, (RADOSTITS et al, 2002) e prurido intenso (BARROS et al, 2006).

As lesões da doença são microscópicas e limitadas ao sistema nervoso central. Não há lesões macroscópicas significativas (JONES; HUNT; KING, 2000; MAXIE; YOUSSEF, 2006). Entretanto em alguns casos é observado hiperemia das leptomeninges. Além disso, podem ocorrer lesões secundárias ao comprometimento neurológico, como

distensão da bexiga ou broncopneumonia por aspiração (BARROS et al, 2006).

Os achados histopatológicos mais importantes incluem meningoencefalite e meningomielite, associadas com ganglioneurite, e neurite nos nervos cranianos e espinhais (MAXIE; YOUSSELF, 2007). O infiltrado é predominantemente de linfócitos e em menor grau de macrófagos e plasmócitos (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

As lesões inflamatórias tendem a ser mais severas nos caninos, do que em outras espécies, como bovinos que, em algumas vezes, pouca ou nenhuma inflamação é observada (ZACHARY, 2009).

Deve ser realizado o diagnóstico diferencial de outras enfermidades que cursam com sinais neurológicos. Entre estas são incluídos intoxicação por chumbo, tetania da lactação (RADOSTIS et al, 2002), polioencefalomalácea (RADOSTIS et al, 2002, FERNANDES; RIET-CORREA, 2007), listeriose (RADOSTITS et al, 2002; JONES; HUNT; KING, 2000; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007), botulismo, encefalite por herpes vírus-5 (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007), febre catarral maligna (BARROS et al, 2006). As plantas de ação direta no sistema nervoso central, ou causadoras de encefalopatia hepática também devem ser diferenciadas como, por exemplo, *Phalaris angusta* ou *Senecio* sp, respectivamente (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2012).

2.8 DIAGNÓSTICO DE RAIVA

Em 1903, Adelchi Negri descreveu os corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos em neurônios, que por muitos anos foram o método mais rápido no diagnóstico da raiva (RODRIGUEZ et al, 2007; WOLDEHIWET, 2005). A imunofluorescência direta (IFD) foi utilizada pela primeira vez em 1958, e em 1970 passou a ser um método de rotina (WOLDEHIWET, 2005).

Hoje, a imunofluorescência direta é considerada o teste padrão ouro para o diagnóstico de raiva, devido a sua alta sensibilidade e especificidade, além da rapidez na execução (WHO, 2013; RODRIGUEZ et al, 2007; JONES; HUNT; KING, 2000). Entretanto a precisão desse teste depende do conhecimento do examinador, do material base utilizado e da qualidade do conjugado antirrábico (WHO 2013, FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). São recomendadas amostras de tronco cerebral e cerebelo para a realização do teste (WHO, 2013).

Com o passar dos anos novas técnicas vem sendo desenvolvidas buscando alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico da doença. Entre estas técnicas estão incluídos testes sorológicos, moleculares e imunológicos (WOLDEHIWET, 2005).

O isolamento viral é um dos métodos utilizados no diagnóstico de raiva. Ele pode ser realizado através da inoculação do vírus em cultura de células ou intracraniana em camundongos (WHO, 2013, RODRIGUEZ et al, 2007). O isolamento do vírus em cultura de células de neuroblastoma é tão eficiente quanto à inoculação em animais, com a vantagem de diminuir o tempo necessário para o diagnóstico de 10-21 dias para 1-2 dias (WHO, 2013). Além disso, há uma tendência em diminuir a utilização de animais, sendo cada vez mais substituídos pela inoculação em cultivos celulares (RODRIGUEZ et al, 2007).

Existem ainda os métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR). Esse método tem sido utilizado com maior frequência como auxiliar no diagnóstico ante mortem em humanos, através da identificação do vírus na saliva e líquido cefalorraquidiano (NAGARAJ et al, 2006). O diagnóstico sorológico é outra ferramenta disponível, sendo frequentemente usado para avaliar capacidade imunogênica das vacinas. (RODRIGUEZ et al, 2007).

Na histopatologia a visualização dos corpúsculos de inclusão de Negri são característicos da infecção pelo vírus da raiva (JONES; HUNT KING, 2000; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007; MAXIE; YOUSSELF, 2007). Entretanto deve se considerar os casos de raiva em que eles não são observados e ainda a existência de pseudo-corpúsculos, que são inclusões inespecíficas no núcleo geniculado lateral e hipocampo de algumas espécies (MAXIE; YOUSSELF, 2006).

Além da sensibilidade e especificidade, os testes de diagnóstico cada vez mais necessitam de rapidez e facilidade de execução. Neste contexto, buscando maior rapidez no diagnóstico, Abreu (2012), desenvolveu a técnica de fixação em micro-ondas para aplicação da histopatologia e imunohistoquímica no diagnóstico da raiva. Com essa técnica o diagnóstico imunohistoquímico foi obtido em cerca de seis horas após a coleta, com correlação de 100% em relação à IFD. A imunohistoquímica tem a vantagem de permitir concluir o diagnóstico especialmente nas situações em que a conservação sobre refrigeração não é possível, inviabilizando a realização de IFD (ABREU, 2012; PEDROSO et al, 2008).

Recentemente, vem sendo descrita também a aplicação de imunohistoquímica sobre esfregaço ou imprint de sistema nervoso de animais suspeitos de raiva, denominada de imunohistoquímica direta ou imunocitoquímica. Diversos trabalhos tem demonstrado sua alta sensibilidade e especificidade, sendo comparáveis a imunofluorescência direta (MADHUSUDANA, SUBHA, 2012; LEMBO et al, 2006).

O desenvolvimento de um teste rápido de imunohistoquímica pode servir como uma alternativa a IFD, facilitando a vigilância local, descentralizando as análises (WHO, 2013).

3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivos:

3.1 OBJETIVO GERAL

Aplicação da imunocitoquímica no diagnóstico de raiva em bovinos e realização de estudo retrospectivo.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Realizar o acompanhamento clínico de animais infectados com o vírus da raiva, caracterizando aspectos epidemiológicos, clínicos, lesões macroscópicas e histológicas da doença.

Aplicar a imunocitoquímica no diagnóstico de raiva.

Realizar estudo retrospectivo nos arquivos do LAPA/CAV e relacionar, como o auxílio da imunohistoquímica, casos positivos de raiva entre 1987 e 2011.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em duas etapas: levantamento de dados nos arquivos do Laboratório de Patologia Animal CAV/UEDESC entre os anos de 1987 e 2011 e acompanhamento clínico de animais suspeitos de raiva entre 2012 e 2013, com aplicação da imunocitoquímica no diagnóstico.

3.1 LEVANTAMENTO DE CASOS DE RAIVA NO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA ANIMAL CAV/UEDESC

Através de levantamento nos arquivos do laboratório de Patologia Animal LAPA/CAV/UEDESC, foram obtidos dados relativos a casos positivos e suspeitos de raiva em bovinos, entre os anos de 1987 e 2011.

A presença de corpúsculo de inclusão de Negri na histopatologia com coloração de hematoxilina e eosina (HE) foi à base para diagnóstico de raiva. Casos com diagnóstico morfológico de meningoencefalite mononuclear, meningoencefalite não purulenta, meningoencefalite viral, porém sem etiologia definida, assim como casos de animais com sinais neurológicos compatíveis com raiva, entretanto sem lesões histológicas, foram considerados suspeitos.

Foram tomados dados relativos à idade dos animais, sinais clínicos, evolução da doença, lesões macroscópicas e histológicas.

3.2 ACOMPANHAMENTO CLÍNICO, NECROPSIA E APLICAÇÃO DA IMUNOCITOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DE BOVINOS INFECTADOS PELO VÍRUS DA RAIVA.

Entre janeiro de 2012 e outubro de 2013, foi realizado acompanhamento clínico de animais suspeitos de raiva. Foram avaliados casos esporádicos nos municípios de Alfredo Wagner e Leoberto Leal e um surto diagnosticado no município de Anitápolis/SC.

Os animais foram necropsiados e amostras de vísceras e sistema nervoso central foram coletadas. Depois de fixadas em formol tamponado 10% foram submetidas à histopatologia com coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). Amostras de encéfalo foram armazenadas resfriadas e submetidas à imunocitoquímica (ICQ) e imunofluorescência direta (IFD). Dados relativos à epidemiologia, sinais clínicos e alterações macroscópicas foram anotados.

3.2.1 Processamento das amostras e aplicação da imunocitoquímica

As amostras coletadas em formalina tamponada 10% foram desidratadas e emblocadas em parafina. Os blocos de parafina foram processadas rotineiramente e coradas com HE (PROPHET et al, 1992), e posteriormente avaliadas em microscópio óptico.

Para a aplicação da imunocitoquímica, foram realizados esfregaços de cerebelo e hipocampo sobre lâminas silanizadas. Em seguida as lâminas foram fixadas em acetona por 10min e submetidas ao seguinte protocolo, utilizando o anticorpo policlonal anti-rabies polyclonal Chemicon #5199:

1. PBSt por 10 min;
2. Água destilada;
3. Peróxido de hidrogênio 3% em metanol por 10 min (2x);
4. Lavar com água destilada;
5. Bloqueio das reações inespecíficas: leite desnatado 5% (diluído em água destilada por 15 min);
6. Lavar com água destilada;
7. Anticorpo primário raiva 1/1000 diluído em PBSt, 1 hora em estufa a 37° (aprox. 150µL por lâmina);
8. Lavar com água destilada;
9. Gotas amarelas (anticorpo secundário) 20 min a temperatura ambiente (suficiente para cobrir o corte);
10. Lavar com água destilada;
11. Gotas vermelhas (streptavidina) 20 min a temperatura ambiente (suficiente para cobrir o corte);
12. Lavar com água destilada;
13. DAB (aprox.50s);
14. Parar a reação em água destilada;
15. Lavar com água destilada;
16. Contra corar com hematoxilina;
17. Desidratar em álcool 80%, 90% e 100% 2 min em cada;
18. Xilol III e IV;
19. Montar a lâmina;
20. Leitura em microscópio óptico.

A imunofluorescência direta foi realizada no Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria/RS, segundo protocolo aplicado no setor (anexo I).

4 RESULTADOS

4.1 LEVANTAMENTO DE CASOS DE RAIVA NO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA ANIMAL CAV/UDESC

O levantamento foi realizado nos arquivos do LAPA/CAV/UDESC entre os anos de 1987 e 2011. Foram relacionados todos os casos positivos de raiva, bem como bovinos com lesões histológicas sugestivas de raiva, mas que a etiologia não pode ser definida. Todos os casos foram submetidos à imunohistoquímica utilizando anticorpo específico para o vírus da raiva. O número de casos suspeitos, bem como os positivos para raiva nas colorações de HE e Shorr e IHQ estão relacionados na tabela 1.

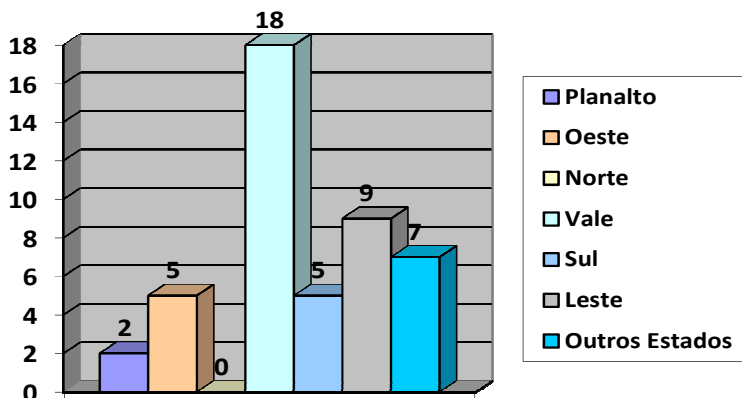
Tabela 1. Levantamento de dados LAPA/CAV/UDESC. Numero de casos testados e positivos para raiva em bovinos.

Espécie	Total de casos suspeitos	Positivos HE/Shorr	Positivos IHQ
Bovino	74	39	46

HE: hematoxilina e eosina; IHQ: imunohistoquímica;

A idade dos animais afetados variou de 4 meses a 10 anos. Os principais sinais clínicos relatados foram incoordenação dos membros posteriores, evoluindo para decúbito e morte em 2 a 7 dias. Salivação excessiva, dificuldade de deglutição, bruxismo e ranger de dentes também foram relatados. As regiões do vale e leste de Santa Catarina foram às com maior numero de casos remetidos ao laboratório (Gráfico 1).

Gráfico 1. Estudo retrospectivo. Regiões do Estado de Santa Catarina com maior número de casos de raiva remetidos ao LAPA/CAV entre 1987 e 2011.



Na histologia as lesões observadas consistiram em infiltrado de linfócitos e macrófagos perivascular, variando de leve (21/46), moderado (14/46) a acentuado (11/46), por vezes associado a focos de gliose (11/46) e necrose neuronal (3/46). Três animais não apresentaram alterações histológicas. Corpúsculos de inclusão de Negri foram observados no citoplasma de neurônios em 85% dos casos (39/46)

A imunohistoquímica foi positiva em 46 dos 79 casos suspeitos. Destes, nove casos que apresentavam diagnóstico inconclusivo, de encefalite não supurativa, meningoencefalite mononuclear severa ou encefalite viral, puderam ser confirmados como raiva através da técnica de IHQ.

4.1 ACOMPANHAMENTO CLÍNICO DE ANIMAIS SUSPEITOS DE INFECÇÃO PELO VÍRUS DA RAIVA.

4.1.1 Epidemiologia, sinais clínicos e lesões macroscópicas.

Para avaliação clinico-patológica foram acompanhados casos de raiva em bovinos nos municípios de Alfredo Wagner, Leoberto Leal e Anitápolis/SC, totalizando 14 animais. O número total de animais, de

animais mortos, necropsiados e mortalidade observada em cada propriedade encontram-se na tabela 2.

Nos municípios de Alfredo Wagner e Leoberto Leal, foram observados casos isolados, enquanto em Anitápolis, a doença foi observada na forma de surto. Neste último foram visitadas seis pequenas propriedades, com número de bovinos não superiores a 44, ao todo morreram 26 animais num período de sete dias. Segundo relatos dos produtores a doença dita como “doença do morcego” não era observada a pelo menos 35 anos. Dessa maneira, nenhuma das propriedades fazia vacinação preventiva contra raiva.

Os animais vivos (13/14) foram examinados clinicamente, e após eutanasiados¹. O período de evolução da doença até a eutanásia e/ou morte natural variou entre o 3^o e 8^o dias da observação dos primeiros sinais clínicos. A idade dos animais acometidos variou de seis meses a 10 anos, tanto machos, quanto fêmeas.

Os sinais clínicos observados caracterizavam-se por salivação excessiva (3/14), anorexia (2/14), prostração (2/14), opstótono (1/14), andar a esmo (5/14), incoordenação motora (14/14), paralisia de membros posteriores (11/14), paralisia de membros anteriores (2/14). Um bovino apresentou forma furiosa da doença com sinais clínicos caracterizados por agressividade, andar incoordenado, olhar atento, movimento frequente das orelhas e prurido.

Durante a necropsia, 12 dos 14 animais não apresentaram lesões macroscópicas, em 2 foram observadas hiperemia das leptomeninges e um apresentou distensão e repleção da bexiga e abomaso. As figuras 1 a 4 demonstram sinais clínicos e achados de necropsia dos casos acompanhados nesse estudo.

¹Eutanasia conforme resolução nº714 de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Tabela 2. Acompanhamento clínico de animais com raiva. Propriedades visitadas entre os anos de 2012 e 2013. Numero total de animais na propriedade, doentes, mortos, necropsiados e mortalidade.

PROP.	Município	NÚMERO DE ANIMAIS			Mortalidade
		Total	Mortos	Necropsiados	
1	Alfredo Wagner	150	6	1	4%
2	Alfredo Wagner	18	3	1	16,6%
5	Leoberto leal	32	1	1	3,1%
6	Anitápolis	17	4	1	23,5%
7	Anitápolis	9	4	1	44,4%
8	Anitápolis	24	7	2	29,2
9	Anitápolis	26	5	3	19,2%
10	Anitápolis	44	3	3	6,8%
11	Anitápolis	8	3	1	37,5%
TOTAL				14	

Figura 1 Sinais clínicos de bovinos infectados pelo vírus da raiva. Salivação excessiva



Fonte: produção do próprio autor.

Figura 2. Sinais clínicos de bovinos infectados pelo vírus da raiva. Paralisia de membros posteriores.



Fonte: produção do próprio autor.

Figura 3. Sinais clínicos de bovinos infectados pelo vírus da raiva. Opstótono.



Fonte: produção do próprio autor.

Figura 4. Lesões macroscópicas de bovinos infectados pelo vírus da raiva. Hiperemia das leptomeninges.

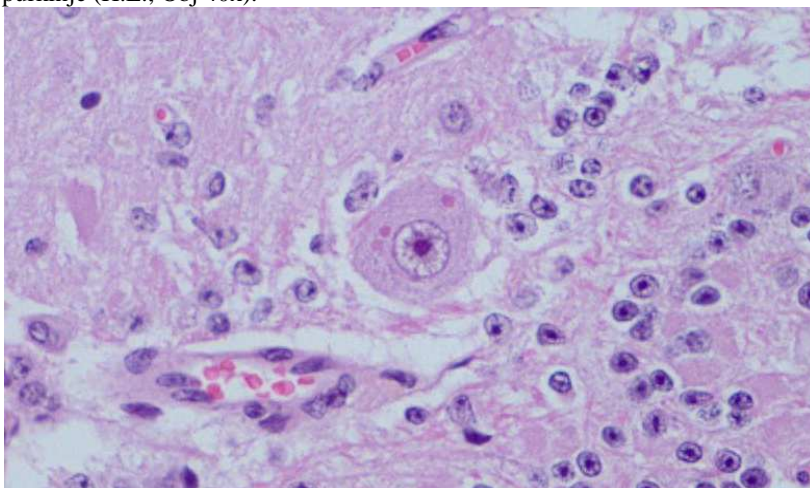


Fonte: produção do próprio autor.

4.1.2 Lesões histológicas

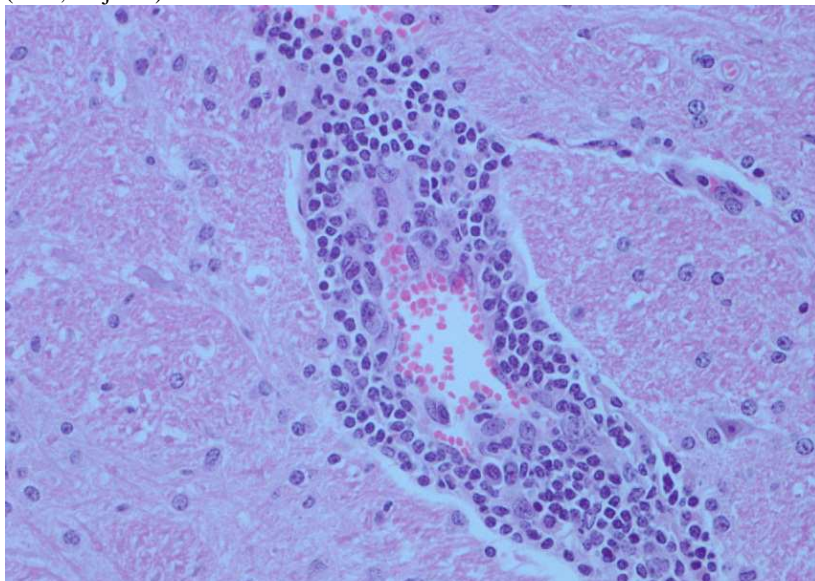
As lesões histológicas observadas consistiam em meningoencefalite linfocítica e macrofágica variando de leve a acentuada. Corpúsculos de inclusão de Negri foram observados em 12 animais. Em um dos casos (Bov8), não foram observadas inclusões de Negri no cerebelo, enquanto nas demais regiões como óbex e hipocampo a intensidade variou de moderada a acentuada. O Bov12 apresentou inclusões de Negri apenas na gânglio trigêmeo. As lesões histológicas podem ser observadas nas figuras 5 e 6.

Figura 5. Lesões histológicas no sistema nervoso de bovinos infectados pelo vírus da raiva. Corpúsculos de inclusão de Negri no citoplasma de neurônio de purkinje (H.E., Obj 40x).



Fonte: produção do próprio autor.

Figura 6. Lesões histológicas no sistema nervoso de bovinos infectados pelo vírus da raiva. Infiltrado de linfócitos e macrófagos perivascular acentuado (H.E., Obj 40x).



Fonte: produção do próprio autor.

4.1.3 Aplicação da imunocitoquímica no diagnóstico de raiva.

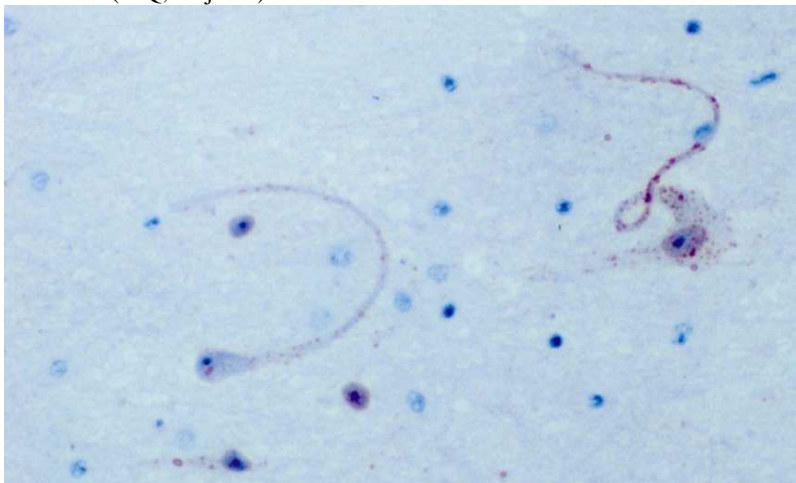
A ICQ foi positiva em 85,7% (12/14) das amostras avaliadas. A imunofluorescência direta foi positiva em 92,8% (13/14). Um dos bovinos positivo na ICQ (Bov 11) foi negativo na prova oficial (IFD). Dois animais (Bov10 e Bov13) foram positivos apenas na IFD. Na tabela 3 podemos observar os resultados da imunofluorescência direta e imunocitoquímica, bem como a presença de inclusões e intensidade da lesão inflamatória pela histopatologia.

Tabela 3. Acompanhamento clínico de bovinos com raiva. Resultados observados através da histopatologia, IFD e ICQ.

Animal	Histologia		Testes	
	C. Negri	Inflamação	IFD	ICQ
Bov1	+	***	+	+
Bov2	+	*	+	+
Bov3	+	**	+	+
Bov4	+	**	+	+
Bov5	+	***	+	+
Bov6	+	*	+	+
Bov7	+	**	+	+
Bov8	+	**	+	+
Bov9	+	*	+	+
Bov10	-	-	+	-
Bov11	+	***	-	+
Bov12	+	**	+	+
Bov13	-	***	+	-
Bov14	+	***	+	+
	12		13	12

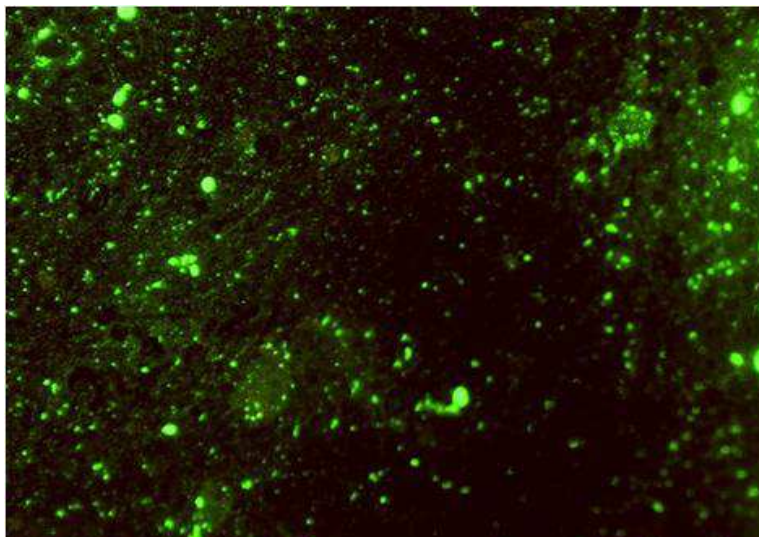
NR: não realizado; Inflamação: *Leve, **Moderada, ***Acentuada; IFD: imunofluorescência direta; ICQ: imunocitoquímica: (+) Positivo, (-) Negativo.

Figura 7. Diagnóstico imunocitoquímico em sistema nervoso de bovino infectado pelo vírus da raiva. Marcação imunopositiva no pericário e axônio de neurônios (ICQ, Obj 40x).



Fonte: produção do próprio autor.

Figura 8. Diagnóstico por imunofluorescência direta. Marcação positiva em neurônios.



Fonte: Laboratório de virologia UFSM.

5 DISCUSSÃO

A situação da raiva no Brasil vem mudando ao longo dos anos. A incidência da doença no país varia bastante conforme a região (RODRIGUEZ et al, 2007). De uma maneira geral, entre 2000 e 2009 foi observada redução nos casos de raiva humana e canina, entretanto o numero de casos em espécies silvestres, assim como em animais de produção vem aumentando (WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011).

O Estado de Santa Catarina é considerado área controlada para raiva no ciclo urbano, contudo a raiva rural possui distribuição ampla e nas regiões leste e norte encontram-se maior número de casos registrados (DIVE/SC, 2012).

Durante o acompanhamento clínico, foram realizadas necropsias de animais infectados pelo vírus da raiva nos municípios de Alfredo Wagner, Leoberto Leal e Anitápolis, os quais estão inseridos nessas regiões. Os dois primeiros municípios contavam com casos registrados de raiva entre 1995 e 2012. Já no município de Anitápolis, embora possua limites geográficos com o município de Alfredo Wagner, a doença não era vista há pelo menos 35 anos, segundo relato dos produtores.

O surgimento da doença em determinados locais pode ser influenciado pelo ciclo biológico do morcego, no qual as disputas entre os machos por fêmeas leva a migração dos morcegos e propagação do vírus. Além disso, os morcegos, por serem os únicos mamíferos que voam podem ultrapassar as barreiras geográficas disseminando a doença (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

Nas propriedades visitadas, no município de Anitápolis, não era realizada vacinação preventiva dos animais, assim, a baixa resposta imunitária associada à migração dos vetores possivelmente seja o principal responsável pelo caráter epidêmico e alta mortalidade observada neste município.

Durante o acompanhamento clínico, 16/17 bovinos apresentaram sinais da forma paralítica da doença. Um animal apresentou a forma furiosa, com sinais de agressividade e prurido intenso, decúbito no 3º dia e morte após o 4º dia do início dos sinais. Embora no Brasil predomine a forma paralítica (BARROS et al, 2006), eventualmente são relatados casos da forma furiosa (LANGOHR et al, 2003). Nestes casos normalmente os sinais são mais graves e ocorrem

em 24 a 48 horas, seguido por paralisia súbita e morte em algumas horas (RADOSTITS et al, 2002).

As alterações histopatológicas observadas neste estudo caracterizadas por meningoencefalite mononuclear perivascular variando de leve a acentuada, eventualmente acompanhada por focos de gliose e necrose neuronal, são similares às descritas por outros autores (LANGOHR et al, 2003; MAXIE; YOUSSEF, 2006; JONES; HUNT; KING, 2000).

Os corpúsculos de inclusão de Negri foram observados em 85,7% (12/14) dos casos clínicos e 85% dos bovinos do estudo retrospectivo. Estima-se que em até 30% dos casos de raiva nessa espécie, as inclusões não sejam visíveis nas colorações de rotina na histologia (BARROS et al, 2006; JONES, HUNT; KING; 2000), embora esses valores possam variar. Lima et al (2005) observou corpúsculos de inclusão em 87% dos bovinos, enquanto Langohr et al (2003) observou em 68% dos encéfalos.

A imunohistoquímica foi utilizada como base para confirmação dos casos de raiva no levantamento de dados, possibilitando a realização deste estudo retrospectivo. Assim como já observado por outros autores (ACHKAR et al, 2010), ela mostrou-se eficiente no diagnóstico da doença, pois 7 casos, tidos como suspeitos, que não apresentavam corpúsculo de Negri, puderam ser diagnosticados como raiva através dessa técnica.

Todavia, quando se trata do diagnóstico imediato da raiva, a imunohistoquímica, embora apresente bons resultados necessita de um tempo relativamente maior para o diagnóstico se comparado a IFD. Com isso, em países como China e Índia, vem sendo descrita a utilização de imunocitoquímica sobre esfregaço ou imprint de SNC de animais e humanos afetados.

Em nosso trabalho amostras de sistema nervoso, coletadas a partir do acompanhamento clínico de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da raiva, foram submetidas a este teste. A marcação antigênica foi observada no interior de neurônios e seus prolongamentos na forma de grânulos marrons em 85,7% (12/14) dos casos.

Embora a sensibilidade observada tenha sido inferior se comparada às descritas por outros autores (LEMBO et al, 2006; MADHUSUDANA et al, 2012), a ICQ é um teste relativamente simples, baseado na visualização, em material fresco da ligação antígeno-anticorpo. Essa técnica tem como principais vantagens à rapidez na execução, de aproximadamente 3,5 horas após a coleta do

material, além de dispensar a utilização de microscópio de campo escuro, o que facilita sua utilização nos laboratórios de diagnóstico (MADHUSUDANA et al, 2012), e possibilita a descentralização das análises.

Em nosso estudo, a ICQ foi positiva, inclusive em um dos casos cuja IFD resultou negativa. Resultados diferentes até mesmo entre as técnicas oficiais de diagnóstico são frequentes (PEIXOTO et al, 2000) e casos positivos de raiva podem não reagir a estes testes dependendo das amostras avaliadas ou localização das lesões (LIMA et al, 2005).

Mais estudos são necessários a fim de aprimorar a ICQ, para que essa possa servir como uma alternativa a IFD. A realização de métodos auxiliares de diagnóstico paralelo ao método oficial é importante, já que nenhuma técnica é 100% eficiente. Especialmente técnicas rápidas e de fácil execução como a ICQ, que permite em poucas horas obter o diagnóstico e direcionar medidas de prevenção e controle.

O diagnóstico rápido de raiva é extremamente importante, pois se trata de uma encefalite fatal, onde além das perdas econômicas dos animais afetados, existe o envolvimento humano, o que torna essa doença uma importante questão de saúde pública.

6 CONCLUSÕES

A imunocitoquímica é um teste promissor, pois é rápido, barato e de fácil execução.

A imunohistoquímica é um método eficiente no diagnóstico da raiva e importante ferramenta para realização de estudos retrospectivos.

REFERÊNCIAS

ABREU, C.C. **Imuno-histoquímica para diagnóstico rápido da raiva bovina e estudo da distribuição periférica do vírus.** 2012.75p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

ACHKAR, S.M.; FERNANDES, E.R., CARRIERI, M.L., CASTRO, A.B.M., BATISTA, A.M., DUARTE, M.I.S., KOTAIT, I. . Sensibilidade da técnica de Imunohistoquímica em fragmentos de sistema nervoso central de bovinos e equinos naturalmente infectados pelo vírus da raiva. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.3, p.211-218, 2010.

BARROS, C.S.L., DRIEMEIER D., DUTRA I.S., LEMOS R.A.A. 1. **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil.** São Paulo:Vallée, p.21-28, 2006.

DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Situação epidemiológica da raiva no estado de Santa Catarina**, 2012. Disponível em: <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/canideos_felinos/Situacao_Raiva_SC.pdf>. Acesso em: 27 de novembro de 2012.

FERNANDES, C.G.; RIET-CORREA, F. Raiva In: RIET-CORREA, F.; SHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A., BORGES, J.R.J. **Doenças dos Ruminantes e Equídeos.** 3ed. v1. Santa Maria: Pallotti, 2007.

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

LIMA, E. F., RIET-CORREA, F., CASTRO, R.S., GOMES, A.A.B., LIMA, F.S. 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.

LANGOHR, I.M., IRIGOYEN, L.F., LEMOS, R.A.A., BARROS, C.S.L. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. **Ciência Rural**, v.33, p.125-131, 2003.

LEMBO, T; NIEZGODA, M.; VELASCO-VILLA, A., CLEVELAND, E.E., RUPPRECHT, C.E. Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. **Emerging Infectious Disease**, v.12, n.2, p. 310-313, 2006.

MADHUSUDANA, S.N.; SUBHA, S.; THANKAPPAN, U., ASHWIN, Y.B. Evaluation of a Direct Rapid Immunohistochemical Test (dRIT) for rapid diagnosis of Rabies in Animals and Humans, **Virologica Sinica**, v.27 n.5, p.299-302, 2012.

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

NAGARAJ, T., VASANTH, J.P., KAMAT, A., MADHUSUDANA, S.N., RAVI, V. 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.

PEDROSO, P.M.O., PESCADOR, C.A., BANDARRA, P.M., RAYMUNDO, D.L., BORBA, M.R., WOUTERS, F., BEZERRA JUNIOR, P.S., DRIEMEIER, D.
Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina.
Pesquisa Veterinária Brasileira. v.28, p. 627-632, 2008.

PEIXOTO, Z.M.P., CUNHA, E.M.S., SACRAMENTO, D.R.V., SOUZA, M.C.A.M., QUEIROZ DA SILVA, L.H., GERMANO, P.L., KROEFF, S.S., KOTAIT, I. Rabies Laboratory Dignosis: peculiar features of samples from equine origin. Brazilian **Journal of Microbiology**, v.31, p 72-75, 2000.

PROPHET E.B. et al. AFIP laboratory methods in histotechnology. Washington: **American Registry of Pathology**, 1994. 274p.

RADOSTITS, O.M., GAY, C.C., BLOOD, D.C., HINCHCLIFF, K.W. 2002. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, Caprinos e equinos.** 9ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1737p.

RODRIGUEZ, L.L., ROEHE, P.M., BATISTA, H., KURATH, G. Rhabdoviridae In: FLORES, E F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. 888p.

STEIN, L.T.; RECH, R.R.; HARRISON, L., BROWN, C.C. Immunohistochemical Study of Rabies Virus Within the Central Nervous System of Domestic and Wildlife Species. **Veterinary Pathology.** v. 47, p.630-636. 2013.

TOKARNIA, C.H. **Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção.** Heliantus: Rio de Janeiro, 2012

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

WHO EXPERT CONSULTATION ON RABIES. 2013 : Geneva, Switzerland, disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85346/1/9789241209823_eng.pdf> Acesso em 27/11/2012.

WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. *Clinica Chimica Acta*. v.351, p.49-63, 2005.

WADA, ROCHA, MAIA-ELKHOURY, 2011. Situação da raiva no Brasil, 2000 a 2009. *Epidemiol. Serv. Saúde*. Brasília, v.20, n.4, p.509-518, out-dez 2011.

ANEXO I

Protocolo para IFD utilizado no laboratório de virologia da Universidade Federal de Santa Maria-UFSM.

Técnica de imunofluorescência direta

A técnica de imunofluorescência direta com utilização de anticorpos fluorescentes (imunoglobulinas antirrábicas marcadas com isotiocianato de fluoresceína = conjugado antirrábico) se constitui em um método rápido, sensível e específico de diagnosticar a infecção rábica em susceptíveis. A prova se baseia no exame microscópico de impressões de fragmentos de tecido nervoso “tratados” com conjugado específico e submetidos à luz ultravioleta. O antígeno rábico, reagindo com o conjugado e iluminado com luz ultravioleta (comprimento de onda de 260 nanômetros), emite uma luz esverdeada fluorescente. A sensibilidade da imunofluorescência depende do espécime (espécie animal e grau de autólise) e da experiência do profissional de diagnóstico.

Materiais necessários

Equipamentos:

- microscópio de imunofluorescência;
- estufa 37°C;
- *timer*.

Reativos:

- conjugado anti-rábico;
- acetona PA;
- PBS

Materiais diversos:

- pinças pequenas;
- tesouras pequenas;
- lâminas de vidro com extremidades foscas;
- lamínulas;
- pipetas diversas;
- tubos diversos;

- estantes para tubos;
- câmara úmida;
- coplin (suporte para lâminas).

Procedimentos:

- Identifique as lâminas.
- Corte fragmentos das diferentes porções do sistema nervoso central (SNC).
- Toque ligeiramente o fragmento na lâmina, fazendo espaços de aproximadamente $0,5\text{cm}^2$ cada, com impressões na mesma lamina.

Observações:

A) Para cães e gatos, recomenda-se fazer impressões do corno de Amon (hipocampo). Para herbívoros e animais silvestres, utilize fragmentos da medula, do cerebelo e do corno de Amon para as impressões.

B) Utilize os fragmentos para o preparo do inoculo destinado à prova biológica.

- Deixe secar a lâmina por aproximadamente 10 a 15 minutos.
- Fixe a lâmina, no mínimo durante 10 minutos, em acetona a -20°C contida em coplin (este e a acetona devem ser mantidos permanentemente em congelador).
- Retire a lâmina da acetona e deixe-a escorrer e secar.
- Após a secagem, caso não utilize as lâminas próprias para IF, faça um círculo em torno das impressões com esmalte, para reter o conjugado.
- Cubra a impressão mais próxima da identificação com a diluição A (cérebro de camundongo normal + conjugado previamente titulado)
- Incube as lâminas por 30 - 45 minutos a 37°C em câmara úmida.
- Enxágue as lâminas com solução salina tamponada (pH entre 7,2 a 7,5), deixando-as em salina durante dez minutos.
- Enxágue as lâminas com água destilada, para evitar a formação de cristais durante a secagem.
- Seque as lâminas.

- Adicione uma gota de glicerina tamponada (pH em 8,5).
- Coloque lamínulas nas impressões.
- Este mesmo procedimento deve ser feito com a lâmina de controle (material positivo). O material utilizado para controle positivo deve ser o cérebro de camundongos infectados com material de rua ou a própria amostra original positiva.

Leitura das lâminas

Nas lamínas com a presença do antígeno poderão ser observadas estruturas de cor verde-maça dotadas de brilho intenso. Os tamanhos destas inclusões podem ser variados: algumas são pequenas (chamadas de areia ou poeira antigênica) e outras apresentam o tamanho comparável aos corpúsculos de Negri.