

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

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E  
MAPEAMENTO DE LESÕES DA RAIVA EM MEDULA ESPINHAL DE BOVINOS  
E EQUINOS

DANIELE MARIATH BASSUINO

PORTO ALEGRE

2015

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

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E  
MAPEAMENTO DE LESÕES DA RAIVA EM MEDULA ESPINHAL DE BOVINOS  
E EQUINOS

DANIELE MARIATH BASSUINO

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: Prof. Dr. David Driemeier

PORTO ALEGRE

2015

## CIP - Catalogação na Publicação

Mariath Bassuino, Daniele

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E  
MAPEAMENTO DE LESÕES DA RAIVA EM MEDULA ESPINHAL DE  
BOVINOS E EQUINOS / Daniele Mariath Bassuino. --  
2015.

54 f.

Orientador: David Driemeier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,  
Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Raiva. 2. Medula espinhal. 3. histologia. 4.  
imuno-histoquímica. I. Driemeier, David, orient. II.  
Título.

Daniele Mariath Bassuino

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E  
MAPEAMENTO DE LESÕES DA RAIVA EM MEDULA ESPINHAL DE BOVINOS  
E EQUINOS

Aprovada em ...

APROVADA POR:

---

Prof. Dr. David Driemeier  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Aldo Gava  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Claudio Severo Lombardo de Barros  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, Vera Lucia Mariath e José Humberto Bassuino pelo apoio e amor incondicional; por me ensinarem o poder da persistência, por cuidarem de mim e me auxiliarem sempre de perto nesta caminhada da vida. À minha família pelo amor, respeito e apoio.

Ao meu professor, orientador, Prof.º Dr. David Driemeier pela oportunidade, pelos ensinamentos proporcionados desde a minha graduação, fonte de inspiração profissional, entusiasmo e dedicação. Por ser aquele que sempre enxerga além e encontra as respostas nos desafios do dia a dia.

Aos professores Saulo Petinatti Pavarini e Luciana Sonne que com tanto amor à patologia completam nossa rotina com conhecimentos, novas ideias e entusiasmo. Em especial ao professor Saulo P. Pavarini pela sua vital contribuição para a construção e desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço especialmente aos que dedicaram suas atenções para que este trabalho se tornasse melhor, ao Prof. Dr. Danilo Carloto Gomes e Raquel Aparecida Sales da Cruz. Ao Guilherme Konradt pelo carinho e cuidado com o meu trabalho como se fosse seu.

À minha família patológica, que torna meus dias mais alegres, Suyene Souza, Gabriela Fredo, Ronaldo Viana, Matheus Viezzer, Fabiana Boabaid, Luiz Oliveira, Caroline Andrade, Verônica Rolim, Lorena Lima, Kívia Hesse, Matheus Reis, Paula Reis, Neusa Castro, Eduardo Oliveira, Maiara e às técnicas Bárbara Krebs e Cíntia Lorenzo.

Ao casal patológico que deixou saudade por aqui, Gregory Juffo e Nadia Antoniassi, por toda ajuda durante essa caminhada e por estarem sempre presentes.

Às minhas amigas Fabiana Wurster, Marcele Bettim Bandineli e Gisele Boos que mesmo de longe, estão sempre perto cuidando de mim.

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

## Resumo

A raiva é uma doença zoonótica causada por um vírus RNA, envelopado, altamente neurotrópico, da família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. Esta dissertação identificou e mapeou as lesões ocasionadas pelo vírus da raiva na medula espinhal de bovinos e equinos. Os casos foram obtidos no período entre janeiro de 2013 a novembro de 2014, através de necropsias realizadas pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) de animais que apresentaram síndrome neurológica. Destes, 33 casos (26 bovinos e sete equinos) foram selecionados com diagnóstico final de raiva, confirmados através do exame histopatológico e imunohistoquímico (IHQ). Todos os casos foram submetidos ao exame de imunofluorescência direta (IFD), e os negativos a este teste, submetidos à inoculação intracerebral em camundongos (ICC). O material foi processado rotineiramente para histologia e corados com hematoxilina e eosina (HE). O exame de IHQ foi realizado na medula espinhal de todos os animais com anticorpo primário policlonal anti-vírus rábico. A medula espinhal foi subdividida nas porções cervical (C), intumescência cervical (IC), torácica (T), lombar (L), intumescência lombar (IL) e sacral (S) para avaliação. As estatísticas descritivas foram feitas no software IBM SPSS Statistics 18<sup>®</sup> e um índice de severidade das lesões observadas foi criado, baseado na soma dos graus das lesões e posteriormente dividido pelo número total de animais de cada espécie. O índice agrupou manguitos perivasculares + microgliose + neuroniofagia e analisou separadamente a presença de células gitter e a intensidade de marcação IHQ. Utilizou-se, ainda, o teste exato de Fisher com nível de significância de 5% através do software Epi Info<sup>™</sup> 7.1.4 para avaliação do risco relativo entre a presença ou ausência de lesão entre encéfalo e medula espinhal. Todos os casos obtiveram imunomarcação positiva no exame de IHQ (100%). Na IFD dois equinos foram positivos (28,5%). Todos os resultados negativos na IFD foram confirmados na ICC, como negativos. Nos bovinos, a IFD foi positiva em 20 casos (76,9%). Os resultados negativos foram submetidos à ICC, onde cinco casos foram negativos e um positivo. A avaliação da medula espinhal, todos os bovinos e equinos apresentaram lesões histológicas. Nos equinos, as lesões inflamatórias se revelaram discretas nas regiões C, IC; moderada em T, L e S e acentuada na secção de IL. Células gitter estiveram discretamente presentes em C, IC e T; em moderada quantidade nas regiões L e S e acentuada em IL. A marcação IHQ nos fragmentos medulares variou de moderada a acentuada. Nos bovinos as lesões inflamatórias foram moderadas em todos os segmentos medulares. Diferente do observado nos equinos, células gitter foram predominantemente discretas. A marcação IHQ foi acentuada e homogênea em todos os segmentos medulares. Nos equinos observou-se uma maior frequência de lesões a partir do segmento T, no entanto, a marcação IHQ revelou discreta variação entre os segmentos. Na distribuição lesional dos bovinos evidenciou-se variação apenas no quesito malacia, que se mostrou mais frequente nos segmentos L, IL e S. Identificou-se, através do método de Fisher, que a coleta da medula espinhal em equinos possibilita uma chance 3,5 vezes maior na detecção de lesões de raiva quando comparado à análise individual do encéfalo.

**Palavras chaves:** Raiva, medula espinhal, bovino, equino, histologia, imunohistoquímica.

## Abstract

*Rabies is a zoonotic disease caused by an enveloped ribonucleic acid (RNA) virus, highly neurotropic, from the Rhabdoviridae family, Lyssavirus genus. This thesis identified and mapped the lesions caused by the rabies virus in the spinal cord of cattle and horses. The samples were obtained within the period from January 2013 to November 2014 from necropsies carried out by the Setor de Patologia Veterinária of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). We selected the thirty three animals (26 cattle and seven horses) that presented neurological syndrome and diagnosis of rabies. Samples from the brain and spinal cord were collected and routinely processed for hematoxylin and eosin (HE) and immunohistochemistry (IHC). The IHC was carried out at the spinal cord of all the animals, with a polyclonal anti-rabid virus as primary antibody. The spinal cord was sectioned at the cervical (C), cervical intumescence (CI), thoracic (T), lumbar (L), lumbar intumescence (LI) and sacral (S) portions to be evaluated. The descriptive statistics of this work was performed using the IBM SPSS Statistic 18<sup>®</sup> software and an index of the severity observed in the lesions was created based on the grades of the lesions and later divided by the total number of animals of each species. The index grouped cuffs of perivascular inflammatory cells, microgliosis and neuronophagia. Then, separately analyzed the presence of gitter cells and their IHC intensity. To evaluate the relative risk between the presence or absence of lesions between the encephalon and the spinal cord the exact Fisher test was carried out with 5% of significance level runned with the Epi Info™ 7.1.4 software. All the cases were positive for the IHC. At the DIF two horses (28.5%) and 20 cattle (76.9%) were positive. To all the samples negative to DIF, the test of inoculation was applied resulting in all horses and five cattle negative, and one cattle positive. Under the HE evaluating of the spinal cord, all the animals presented histologic lesions. In the horses, the inflammatory lesions were discrete in the C and IC sections; moderate in T, L and S; and accentuated in LI. Gitter cells were discretely present in the C, CI and T sections; moderate in L and S; and accentuated in LI. IHC of the spinal cord fragments varied from moderated to accentuate. The inflammatory lesions from cattle samples were moderate in all of the spinal cord sections. Differently from the observed in horses, gitter cells were predominantly discrete. The IHC staining was accentuated and homogenous in all spinal cord sections. In the horses lesions in the T section were frequently observed; however, IHC staining revealed discrete variation between the sections. The lesions distribution from cattle samples highlighted variation only in the issue concerning malacia, which was frequently demonstrated in the L, LI and S sections. The Fisher test identified that the gathering of horses spinal cords allows a 3.5 times higher chance of detection of rabies lesions than when the individual analysis of the brain is made.*

**Key words:** Rabies, spinal cord, cattle, horse, histology, immunohistochemistry.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1. Caracterização clínico-patológica da raiva em bovinos e equinos:** **A. Bovino:** paralisia de membros pélvicos. **B. Equino:** paralisia de membros pélvicos. **C. Bovino, bexiga:** acentuadamente distendida. **D. Equino, intestino grosso:** repleto com fezes ressequidas. **E. Bovino, medula espinhal:** intumescência cervical, áreas de hemorragia em substância cinzenta. **F. Equino, medula espinhal:** intumescência cervical, áreas de hemorragia em substância branca e cinzenta.....50

**Figura 2. Medula espinhal equinos - índice de classificação de severidade:** **A.** Lesões inflamatórias (manguitos perivasculares, microgliose, neuroniofagia). **B.** Presença de células gitter. **C.** Marcação imuno-histoquímica.....51

**Figura 3. Caracterização das lesões histológicas e imuno-histoquímicas em medula espinhal de equinos com raiva:** **A. Intumescência lombar:** visualizam-se manguitos perivasculares linfoplasmocitário multifocal acentuado associado a áreas multifocais de hemorragia, Obj. 10x, HE. **B. Intumescência lombar:** observa-se manguitos perivasculares linfoplasmocitário multifocal acentuado associado a microgliose multifocal, Obj. 20x, HE. **C. Lombar:** neuroniofagia acentuada, Obj. 40x, HE. **D. Intumescência lombar:** grande quantidade de células gitter, além de manguito perivascular linfoplasmocitário, Obj. 20x, HE. **E. Lombar:** imunomarcção acentuada de neurônios e seus prolongamentos, Obj. 20x, Vector@NovaRED. **F. Sacral:** imunomarcção positiva em neurônio, Obj. 40x, Vector@NovaRED.....52

**Figura 4. Medula espinhal bovinos - índice de classificação de severidade:** **A.** Lesões inflamatórias (manguitos perivasculares, microgliose, neuroniofagia). **B.** Presença de células gitter. **C.** Marcação imuno-histoquímica.....53

**Figura 5. Caracterização das lesões histológicas e imuno-histoquímicas em medula espinhal de bovinos com raiva:** **A. Intumescência lombar:** visualizam-se manguitos perivasculares linfoplasmocitário multifocal moderado, Obj. 4x, HE. **B. Sacral:** observa-se acentuada neuroniofagia, Obj. 40x, HE. **C. Sacral:** grande quantidade de células gitter, Obj. 40x, HE. **D. Lombar:** corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico (Corpúsculo de Negri), Obj. 40x, HE. **E. Cervical:** imunomarcção acentuada de neurônios e seus prolongamentos, Obj. 20x, AEC. **F. Torácica:** imunomarcção positiva do pericário neuronal, Obj. 40x, AEC.....54



## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> Frequência da ocorrência de lesões e de marcação imuno-histoquímica por localização nas secções medulares de equinos.....  | 48 |
| <b>Tabela 2</b> Frequência da ocorrência de lesões e de marcação imuno-histoquímica por localização nas secções medulares de bovinos ..... | 49 |

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>  | <b>13</b> |
|          | 2.1 HISTÓRICO.....  | 13        |
|          | 2.2 ETIOLOGIA.....  | 15        |
|          | 2.3 EPIDEMIOLOGIA.....  | 16        |
|          | 2.4. PATOGENIA.....   | 19        |
|          | 2.5 SINAIS CLÍNICOS.....  | 20        |
|          | 2.6 ACHADOS DE NECROPSIA .....  | 22        |
|          | 2.7 HISTOPATOLOGIA .....  | 22        |
|          | 2.8 DIAGNÓSTICO E DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL .....   | 24        |
|          | REFERÊNCIAS.....  | 27        |
|          | <b>ARTIGO .....</b>   | <b>34</b> |
|          | <b>CARACTERIZAÇÃO DE LESÕES EM MEDULA ESPINHAL DE BOVINOS E EQUINOS COM RAIVA .....</b> | <b>35</b> |
|          | <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>  | <b>38</b> |
|          | <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>39</b> |
|          | <b>DISCUSSÃO.....</b>   | <b>42</b> |
|          | REFERÊNCIAS.....  | 45        |
| <b>3</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>   | <b>55</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Distúrbios do sistema nervoso central (SNC) em bovinos e equinos abrangem um importante grupo de enfermidades responsáveis por grandes perdas econômicas em todo o mundo. Em um levantamento realizado de 6.021 bovinos necropsiados no Rio Grande do Sul, cerca de 10% dos casos apresentaram sinais neurológicos (SANCHES et al., 2000) e representaram no estado do Mato Grosso do Sul 47,38% dos casos necropsiados (MORI; LEMOS, 1998). Em equinos, existem diversas doenças neurológicas, criando assim vários diagnósticos diferenciais. As anormalidades mais comumente observadas incluem malformações de corpos vertebrais, traumas, infecções (virais, bacterianas, parasitárias), abiotrofia e ainda lesões idiopáticas e degenerativas (REED et al., 1981). A raiva em equinos é considerada rara na literatura internacional (WHO, 1986), entretanto, no Brasil, entre os anos de 1980-1994 foram diagnosticados 111 casos de raiva em equinos (PEIXOTO et al., 2000). No estado do Rio Grande do Sul, em um levantamento realizado no período de 1978-1998 foram diagnosticados 12 casos em equinos e 77 em bovinos (RIET-CORREA et al., 1999).

A raiva é uma doença zoonótica (SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995) de notificação obrigatória, invariavelmente fatal, que afeta o SNC de humanos e de quase todas as espécies de mamíferos domésticos e silvestres (BARROS et al., 2006). É causada por um vírus RNA, envelopado, altamente neurotrópico, da família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* (RADOSTITIS et al., 2002). Possui os ciclos urbano, rural, silvestre e aéreo. O ciclo urbano caracteriza-se pela ocorrência da doença em cães e gatos. O ciclo rural é constituído por herbívoros e outros animais de produção, e o silvestre inclui animais silvestres como raposas, guaxinins, gambás e primatas. O referido ciclo aéreo é importante na manutenção do vírus entre as várias espécies de morcegos que disseminam esse agente etiológico (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

Na América do Sul, a raiva dos herbívoros ocorre em surtos cíclicos e é geralmente transmitida pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus* (HUDSON et al., 1996, BARROS et al., 2006). Condições climáticas favoráveis, a existência de abrigos naturais ou artificiais e a distribuição da população de bovinos são responsáveis pela extensão e estabilidade enzoótica da raiva em uma região (BARROS et al., 2006).

A raiva pode cursar com uma forma furiosa e uma forma parálitica, a primeira relacionada a lesões cerebrais e mais frequente em caninos. A raiva parálitica está associada a lesões em medula espinhal e tronco encefálico e é mais comum em herbívoros (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). O quadro clínico da raiva em bovinos é variável, e muitos dos sinais clínicos são comuns a outras enfermidades que afetam o SNC. Estes sinais clínicos são determinados, principalmente, pela concentração do inócuo viral, pela patogenicidade da cepa infectante, pela distância entre o local da inoculação e o encéfalo e pelo estado imune do animal (JUBB; HUXTABLE, 1993). Os sinais clínicos mais comumente observados incluem incoordenação dos membros pélvicos, evoluindo para paresia e paralisia, relaxamento do esfíncter anal, ausência de reflexo anal, paralisia de cauda, tremores de cabeça, diminuição da visão, opistótono, bruxismo, salivação, fezes ressequidas e escassas, retenção ou incontinência urinária e mugidos roucos (MORI; LEMOS, 1998; LANGOHR et al., 2003). Na forma furiosa há mugidos constantes, agressividade, hiperexcitabilidade, hiperestesia, prurido intenso e manifestação de irritação cutânea (SWANEPOEL, 1994; LANGOHR et al., 2003).

Na macroscopia não há lesões significativas na raiva (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007), no entanto hiperemia das leptomeninges (BARROS et al., 2006) e lesões secundárias como pneumonia aspirativa e distensão da bexiga podem ser observadas (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Pedroso et al. (2010) descreve ainda áreas de hemorragias acentuadas na substância cinzenta da medula espinhal de equinos necropsiados com a doença. Achados patológicos importantes são visualizados na microscopia e incluem meningoencefalite e meningomielite com acúmulos perivasculares de linfócitos, e em menor grau de macrófagos e plasmócitos, associado a ganglioneurites (LANGOHR et al., 2003; RECH et al., 2006; MAXIE; YOUSSEF, 2007). Além disso, a visualização de corpúsculos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos, denominados de corpúsculos de Negri, são indicadores específicos da infecção (JONES; HUNT; KING, 2000). É possível observar ainda, gliose com proliferação da micróglia, degeneração neuronal, satellitose e neuroniofagia (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Em bovinos, caprinos, ovinos e equinos as lesões mais proeminentes são em tronco encefálico e medula espinhal, no entanto, lesões em cerebelo e cérebro são encontradas na maioria dos animais (LANGOHR et al., 2003; LIMA et al., 2005).

O objetivo deste trabalho consiste na caracterização morfológica e imunohistoquímica das lesões ocasionadas pelo vírus da raiva na medula espinhal de bovinos e equinos.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Histórico**

A raiva, palavra derivada do sânscrito, que significa “fazer violência”, é uma entidade arcaica e uma das doenças infecciosas mais antigas a ser reconhecida (RODRIGUEZ et al., 2007). O primeiro registro escrito da doença ocorreu no século XXIII a.C., através do código de Eshunna, elaborado na Mesopotâmia: “Se um cão é louco e as autoridades levarem o fato ao conhecimento de seu proprietário, se ele não mantê-lo sob sua guarda e ele morder um homem e causar sua morte, então o proprietário deverá pagar dois terços de uma mina de prata” (THÉODORIDIS, 1986). O código de Eshunna já evidencia, nesta época, a relação entre a mordida e o perigo de morte. Desde então, inúmeras referências e citações são feitas a respeito da doença e indivíduos infectados, geralmente envoltos por mitos e crenças religiosas.

No século IV a.C., Aristóteles mencionou a “loucura dos cães” e associou corretamente o envolvimento da doença com animais. No século I d.C. o romano Celsus descreve os aspectos clínicos da infecção humana: “O paciente é torturado pela sede e ao mesmo tempo pela repulsa invencível à água” (BAER; NEVILLE; TURNER, 1996).

Em 1546, período da Renascença, surgiu um notável tratado intitulado de “A ferida incurável” de Fracastoro, um médico italiano que claramente relata que seres humanos são susceptíveis à raiva e descreve um caso apresentando as manifestações clínicas em um homem infectado e o período de incubação da doença (KAPLAN; KOPROWSKI, 1980).

A ocorrência da enfermidade no Novo Mundo é, no entanto, menos compreendida, devido a uma escassez de registros da época. Nas Américas a doença foi reportada no México em 1709 (BRAVO, 1978). Em 1753 foi descrita na América do Norte em uma colônia na Virginia e em 1768 em Boston (FITZPATRICK, 1931). Acredita-se que a introdução da doença no Novo Mundo tenha sido em decorrência à colonização europeia, de seus cães e suas doenças (SMITH et al., 1992).

Apenas em 1804, Zinke provou que através da saliva de um cão infectado quando colocada sobre uma ferida aberta de um cão normal, era capaz de transmitir a doença. Em 1879, Galtier, realizou uma transmissão experimental em coelhos e mostrou que a doença podia ser desenvolvida a partir de inoculação e da mordida (KOPROWSKI, 1985).

O estudo sobre a interação viral-neuronal ocorreu apenas em 1903, por Negri, com detecção de corpúsculos intracitoplasmáticos em neurônios de animais afetados, o que tornou possível o diagnóstico da doença (KRISTENSSON et al., 1996).

A pesquisa de Pasteur talvez tenha sido a maior e mais conhecida conquista histórica sobre a enfermidade. Pasteur concluiu a partir da sintomatologia clínica e dos achados histológicos, que o sistema nervoso central e principalmente o bulbo que une a medula espinhal ao encéfalo estavam particularmente ligados à doença (STEELE; FERNANDEZ, 1991). Além disso, entre 1881 e 1885 desenvolveu o método de passagens do vírus da raiva em coelhos, originando o termo “vírus fixo” que causava morte de coelhos aos 11-12º dia. Essa amostra foi a base para que Pasteur e sua equipe desenvolvessem a primeira vacina contra a doença. Para tanto, inativou o agente através de calor brando, mantendo medulas de coelhos dessecando em estufa a 37°C. Após nove a dez dias de incubação, a patogenicidade era reduzida (BAER, 1991). No dia 6 de julho de 1885, um menino de nove anos de idade foi mordido por um cão raivoso (apresentava mordidas em várias partes do corpo, inclusive na cabeça) e recebe a profilaxia pós-exposição com a vacina desenvolvida por Pasteur. O menino sobrevive, e este dia torna-se um marco na história da raiva (KOPROWSKI, 1985). A vacina de Pasteur, com modificações posteriores, é a medida profilática aceita e seu protocolo é difundido por todo mundo no século XX. Babes em 1889 descreve um novo método profilático para o combate à doença. O método consiste na administração simultânea do soro anti-rábico, contendo anticorpos contra o vírus da raiva, juntamente com a vacina (BABES, 1912). Este método foi considerado pela Organização Mundial de Saúde, em 1954, como mais eficiente do que o uso da vacina isoladamente (HABEL; KOPROWSKI, 1955).

Em 1960 realizou-se a cultura do vírus em células diploides humanas, inaugurando uma nova época da virologia e a segunda geração de vacinas contra o vírus da raiva. Essa nova produção possibilitou o desenvolvimento de vacinas mais eficientes e seguras (KOPROWSKI, 1985), já que eliminava muitos dos problemas relacionados

àquelas produzidas a partir de tecido nervoso, especialmente, relacionados a reações alérgicas. Também nesta década, a imunofluorescência direta tornou-se, em função de sua grande sensibilidade e especificidade, o principal método de diagnóstico rápido de raiva, permanecendo como tal até o presente (RODRIGUEZ et al., 2007).

## 2.2 Etiologia

A raiva é causada por um vírus RNA, envelopado, pertencente a ordem *Mononegavirales*, que compreende todos os vírus que possuem o genoma formado por uma única molécula de RNA de polaridade negativa (SWANEPOEL, 2004). Dentro desta ordem, o vírus da raiva é classificado na família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*, juntamente com outros denominados “vírus relacionados à raiva” (RODRIGUEZ et al., 2007). Os componentes da família *Rhabdoviridae* infectam uma grande variedade de espécies, incluindo artrópodes, plantas e vertebrados. São classificados em seis gêneros, quatro destes de interesse em medicina veterinária: *Lyssavirus*, *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus* e *Novirhabdovirus*. Os gêneros *Cytorhabdovirus* e *Nucleorhabdovirus* são exclusivos de plantas (LYLES; RUPPRECHT, 2007).

Os *Lyssavirus* são um conjunto de vírus adaptados para a replicação no sistema nervoso central. Possuem sete genótipos: vírus da raiva (RABV; genótipo 1), vírus do morcego de Lagos (LBC; 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; LYLES; RUPPRECHT, 2007; MAXIE; YOUSSEF, 2007). Outro lissavírus associado a morcegos (vírus Aravan) foi recentemente descrito na Ásia central e um novo genótipo tem sido proposto (ARAI et al., 2003). Os lissavírus foram classificados em dois filogrupos em relação a sua patogenicidade e imunogenicidade: I - compreende todos os que causam encefalites fatais semelhantes a raiva em humanos e inclui os genótipos 1, 4-7; II - formado pelos vírus Mokola e vírus do morcego de Lagos (genótipos 2 e 3), menos patogênicos para os humanos (RODRIGUEZ et al., 2007; MAXIE; YOUSSEF, 2007). O vírus da raiva é ainda dividido em dois biotipos: vírus “fixo”, base das cepas vacinais, suas propriedades são estabilizadas em laboratório através de passagens intracerebrais seriadas. Este biotipo é altamente neurotrópico, no entanto, não é detectado na saliva e não produz

corpúsculos de Negri. Outro biotipo, denominado de vírus “de rua”, é a forma que se mantém enzooticamente e epizooticamente, provoca lesões degenerativas em neurônios, produzindo corpúsculos de Negri. Além do neurotropismo, este biotipo possui tropismo pelas glândulas salivares, se replicando neste tecido e se fazendo presente na saliva (MAXIE; YOUSSEF, 2007; GRAÇA et al., 2010). O vírus “de rua” é, então, o biotipo isolado nos casos de campo (FEKADU et al., 1988).

O vírus da raiva apresenta forma de projétil, característica da família, com 75 nm de diâmetro e comprimento entre 100 e 300 nm. A partícula apresenta-se como um cilindro denso formado pelo genoma em formato de mola e envolto por uma proteína denominada nucleoproteína (N), que juntamente com outras três proteínas estruturais (P, M e L) formam o nucleocapsídeo com simetria helicoidal. O nucleocapsídeo é envolto por um envelope derivado das membranas celulares, onde estão inseridos trímeros de moléculas da glicoproteína G. O genoma codifica cinco proteínas, na seguinte ordem: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína da matriz (M), glicoproteína (G) e a RNA polimerase dependente de RNA (L) (RODRIGUEZ et al., 2007).

O vírus da raiva, como todos os vírus envelopados, é sensível a detergentes e solventes lipídicos. Sua resistência fora do hospedeiro é baixa e é rapidamente inativado a temperaturas altas, de modo que é destruído a 50°C por 15 minutos. Além disso, é sensível ao dessecamento, luz solar, radiação ultravioleta, hipoclorito de sódio, soda cáustica a 2%, solventes de gordura e formalina. No entanto, poderá manter-se viável por longos períodos a 4°C e por tempo indefinido quando em temperaturas mais baixas que -70°C (RODRIGUEZ et al., 2007).

### **2.3 Epidemiologia**

A raiva afeta animais de sangue quente de todas as idades. Acomete o homem e quase todas as espécies de mamíferos domésticos e silvestres, que apresentam graus variados de susceptibilidade (ACHA; SZYFRES, 1986). É uma enfermidade endêmica em muitas partes do mundo e uma importante zoonose (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007) com mortalidade mundial estimada 55.000 óbitos de humanos por ano, a maioria transmitida por cães, principalmente na África e Ásia (KNOBEL et al.,



2005). Ainda não registrada na Austrália e considerada erradicada em algumas regiões como Grã Bretanha, Nova Zelândia e Islândia (GRAÇA et al., 2010), a doença ocorre em todo o Brasil com importância em todos estados e regiões. Em áreas enzoóticas, como América Latina, estima-se que a população de bovinos sob risco é de 70 milhões, com uma mortalidade anual de 100.000 a 500.000 animais (SWANEPOEL, 1994) e um prejuízo de 50 milhões de dólares para pecuária (KING; TURNER, 1993).

Nas Américas, houve, no entanto, uma redução de cerca de 80% nos casos de raiva humana e canina entre os anos de 1993 e 2002, devidos principalmente às campanhas de vacinação de cães e ao tratamento das pessoas expostas. No Brasil, no ano de 1991 foram registrados 65 óbitos humanos e em 1992, 50 casos fatais haviam sido diagnosticados, destes, 38 só na região nordeste (GERMANO, 1994).

A ocorrência da doença depende da existência de vetores na região (RADOSTITIS et al., 2002). A raiva é transmitida, principalmente, através da mordida e devido a este fato, tornam os carnívoros e quirópteros, os hospedeiros mais importantes da doença. Herbívoros e outros animais, não são relevantes na epidemiologia da doença (ACHA; SZYFRES, 1986). Dados revelam que de um total de 167 países pesquisados, 87 mantêm reservatórios na população canina, os quais são responsáveis por 99% de todos os casos de raiva humana e mais de 90% de todos os tratamentos pós-exposição (KASEMPIMOLPORN et al., 1991). No entanto, existe um alerta sobre a transmissão por animais selvagens, incluindo morcegos hematófagos, já que em diversas regiões há exposição excessiva de pessoas aos morcegos. Wada et al. (2011) realizaram um estudo que descreve a situação epidemiológica da raiva humana e em animais que foram notificados no Brasil no período entre 2000 a 2009. Foram registrados, em média, 16 casos por ano em humanos no país, com maior prevalência na região nordeste (52%), seguido do Norte (38%), Sudeste (6%) e Centro-oeste (4%). A raiva humana na região Sul do país não é observada desde 1987, o último caso localizado no estado do Paraná, transmitido por morcego (SCHNEIDER et al., 1996).

Nesta última década observou-se uma redução no número de casos notificados de raiva em caninos e no ano de 2009, 26 casos de raiva nesta espécie foram notificados no Brasil, distribuídos em oito estados (WADA et al., 2011). Nos animais de produção, no período entre 2002-2009, a raiva ocorreu em 9.277 animais: 88% em bovinos, 10% em equinos, 2% outros animais de produção (WADA et al., 2011).

Em um estudo retrospectivo realizado por Sanches et al. (2000) no Sul do país, o diagnóstico de raiva correspondeu a 49,5% do total de 305 necropsias de bovinos que apresentaram distúrbios neurológicos em 36 anos analisados. Resultados semelhantes foram observados por Galiza et al. (2010) no estado da Paraíba, que observaram um total de 48% de óbitos causados pelo vírus da raiva em 411 necropsias de bovinos em um período de oito anos analisados.

No Brasil, a raiva herbívora é essencialmente transmitida por morcegos hematófagos, sendo o *Desmodus rotundus* o de maior importância. A existência da raiva herbívora amplia a população de morcegos infectados e, com isso, aumenta a exposição de humanos (GRAÇA et al., 2010).

A raiva possui quatro ciclos: urbano, caracterizado pela ocorrência da doença em cães e gatos; rural, constituído por herbívoros; silvestre, que inclui animais silvestres como raposas, guaxinins, gambás e primatas (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007), sendo o cachorro-do-mato (*Cerdocyonthus*) e os saguis (*Callythrix jacchus*) os dois principais reservatórios (WADA et al., 2011); e o aéreo, importante na manutenção do vírus entre as várias espécies de morcegos que disseminam o agente etiológico (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Todas as espécies de morcegos são susceptíveis à raiva e podem transmitir a doença. Não são portadores sadios já que desenvolvem sinais clínicos e evoluem para a morte (RADOSTITIS et al., 2002).

A doença tende a ser sazonal e cíclica, devido ao ciclo biológico do morcego. Reaparece com a periodicidade de sete anos, relacionado a um maior número de morcegos infectados e declina quando estes morrem. No período compreendido entre 2002-2009 foram registrados 1.163 casos de raiva em morcegos no país: 80% não hematófagos e 20% hematófagos (WADA et al., 2011). O desaparecimento cíclico da enfermidade não representa um controle efetivo da doença (MORI; LEMOS, 1998). Considerando o período de incubação do vírus nos morcegos, e posteriormente, nos animais agredidos, o pico de incidência tende a ocorrer no outono (MORI; LEMOS, 1998), distribuição sazonal essa, não observada na região semi-árida (LIMA et al., 2005) e possivelmente não ocorrente em outras áreas de clima tropical (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

Na ocorrência dos focos de raiva, a morbidade normalmente observada é inferior a 10%, porém coeficientes superiores a 30% podem, também, ser encontrados

(LANGOHR et al., 2003). A letalidade é invariavelmente de 100% (BARROS et al., 2006).

#### **2.4. Patogenia**

O desenvolvimento da doença depende da inoculação do vírus em uma ferida recente, via percutânea, o que geralmente ocorre através de uma mordida por um animal infectado (MAXIE; YOUSEEF, 2007; JACKSON, 2008); entretanto, infecção respiratória também tem sido incomumente descrita após exposição ao vírus em morcegos de cavernas (CONSTANTINE, 1967; GIBBONS, 2002), além de exposição humana laboratorial acidental (CONOMY et al., 1977), contaminação de mucosas (olhos, narinas e boca) e transplante de córnea e outros órgãos – transmissão iatrogênica (JACKSON, 2007). Uma vez inoculado no indivíduo, o vírus passa por uma fase de replicação inicial nas fibras musculares locais e, então, entra nas terminações nervosas periféricas, ligando-se aos receptores nicotínicos da acetilcolina na junção neuromuscular (LENTZ et al., 1982). Neste sentido, o vírus se move da periferia ao sistema nervoso central pelo transporte axoplasmático retrógrado rápido, via nervos sensoriais e motores, em uma taxa de 100 mm por dia (GRAÇA et al., 2010; ZACHARY, 2013). No sistema nervoso central, o vírus se multiplica e se dissemina via neurônios autonômicos e sensoriais, de forma centrífuga, podendo atingir praticamente todos os órgãos (JACKSON, 2008; RODRIGUEZ et al., 2007; GRAÇA et al., 2010). O vírus se replica nas glândulas salivares e a excreção pela saliva é o principal mecanismo de disseminação e perpetuação na natureza (RODRIGUEZ et al., 2007). O envolvimento de nervos próximos aos folículos pilosos é o que torna possível o diagnóstico de raiva em biopsias de pele em humanos (BRYCESON et al., 1975). Diferenças na susceptibilidade entre espécies são relatadas, em parte devido a quantidade de receptores nicotínicos da acetilcolina nos músculos; uma marcada diferença tem sido reportada no músculo de raposas (alta quantidade e alta susceptibilidade) e de marsupiais (baixa quantidade e baixa susceptibilidade) (BAER et al., 1990).

O período de incubação da raiva é muito variável e corresponde ao tempo que o vírus leva desde sua inoculação até sua chegada no SNC e o início dos sinais clínicos. Fatores como a amostra de vírus envolvida, o local da mordedura, a carga viral inoculada, a susceptibilidade da espécie e a imunidade do animal agredido são

determinantes (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007; MAXIE; YOUSSEF, 2007). Mordidas na cabeça resultam, geralmente, em períodos de incubação mais curtos quando comparado a mordidas nas extremidades (RADOSTITIS et. al., 2002). Dados na literatura referem o período de incubação normalmente ocorre de 14 dias a 12 semanas (RODRIGUEZ et al., 2007; GRAÇA et al., 2010), no entanto, períodos superiores a um ano já foram relatados (SMITH et al., 1991).

## **2.5 Sinais Clínicos**

A raiva caracteriza-se por uma forma clínica parálitica e outra furiosa (MORI; LEMOS, 1998). Em bovinos, poderão ocorrer as duas formas, entretanto, a primeira é a mais frequentemente observada (LANGOHR et al., 2003; SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995). Por causar lesões difusas no SNC, apresenta uma grande variação na apresentação dos sinais clínicos (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007), que podem, ainda, se mostrar inespecíficos em bovinos e equinos (SMITH, 2006). A raiva furiosa está relacionada, principalmente, a lesões cerebrais, e é mais comumente observada em caninos, que apresentam alterações de comportamento como inquietação, hiperexcitabilidade, agressividade, fotofobia, salivação e ocasionalmente febre (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007; RODRIGUEZ et al., 2007). A forma parálitica, mais frequente em herbívoros, está associada a lesões da medula e tronco encefálico (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

Os sinais clínicos iniciais em bovinos e equinos incluem anorexia, depressão e ataxia moderada. Com a evolução da doença, poderão ocorrer contrações espásticas de grupos musculares, hiperestesia, hipermetria e deficiências proprioceptivas conscientes e inconscientes (SMITH, 2006). O animal apresenta dificuldade de deglutição devido a paralisia muscular progredindo para paralisia de membros (RODRIGUEZ et al., 2007). No Brasil, há o predomínio da forma parálitica nos bovinos, que apresentam incoordenação dos membros pélvicos, paresia, paralisia, relaxamento do esfíncter anal com protusão do ânus, ausência do reflexo anal, paralisia da cauda, tremores de cabeça, diminuição da visão, opistótono, bruxismo, salivação, fezes ressequidas e escassas, retenção ou incontinência urinária e mugidos roucos, podendo dar a impressão de que o animal encontra-se engasgado (MORI; LEMOS, 1998; LANGOHR et al., 2003). A apresentação da forma furiosa em bovinos inclui mugidos constantes e roufenhos, que

podem, ocasionalmente, se mostrar violentos a ponto de produzir enfisema cutâneo, além de agressividade, hiperexcitabilidade, hiperestesia, prurido intenso e manifestações de irritação cutânea (SWANEPOEL, 1994; LANGOHR et al., 2003). Estes sinais evoluem para decúbito, primeiro esternal, e posteriormente lateral, movimentos de pedalagem e morte (GRAÇA et al., 2010). Sinais de alterações de tronco encefálico podem ser observados e incluem paralisia de língua ou mandíbula, estrabismo, nistagmo, dificuldade de deglutição, diminuição da sensibilidade facial, paralisia do maxilar, trismo mandibular ou diminuição dos reflexos palpebral e pupilar (LANGOHR et al., 2003; LIMA et al., 2005).

Equinos apresentam sinais clínicos semelhantes, no entanto, sinais cerebrais e de tronco encefálico são aparentemente mais frequentes. Além de paresia e paralisia de membros, depressão, agressividade, galope desenfreado e ataxia podem ser observados (LIMA et al., 2005). Muitas vezes podem apresentar manifestações semelhantes ao quadro de laminite e cólica (SMITH, 2006; JOHNSON, 2011). Singh et al. (1990) relata forma furiosa em dois equinos que incluiu sinais de hiperexcitabilidade, nervosismo, irritação, mordidas, cegueira e rolamentos. Green et al. (1992), relataram 21 casos de raiva em equinos e os principais sinais clínicos observados em ordem decrescente foram de decúbito, hiperestesia, paralisia de cauda e ânus, febre, ataxia e paraplegia, claudicação, cólica e paralisia de laringe.

A raiva é extremamente incomum em caprinos e ovinos, mas estes demonstraram ser altamente susceptíveis ao vírus quando inoculados experimentalmente (GOMES, 2004). Caracterizam-se por alterações no comportamento, agressividade, convulsões (RIET-CORREA et al., 1999), dificuldade de locomoção dos membros pélvicos, tremores musculares, opistótono e decúbito lateral (BARROS, 2003). Muales, ovinos e suínos possuem geralmente a forma excitatória da raiva (ZACHARY, 2013).

Geralmente após dois a três dias do início dos sinais clínicos os ruminantes assumem decúbito permanente. Em equinos, este quadro é menos frequente, e tende a ocorrer mais tardiamente (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

O curso clínico médio da raiva é de cinco dias, podendo variar de dois a dez dias (LANGOHR et al., 2003). A duração do curso clínico depende essencialmente do

cuidado para com os animais acometidos, com administração de água e alimento, os animais poderão sobreviver por um tempo maior (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

Em humanos a raiva é frequentemente diagnosticada de forma errônea ou de forma tardia devido a baixa familiaridade dos médicos à doença. Os sintomas da fase prodrômica em humanos incluem mal-estar, dores de cabeça, febre, ansiedade e agitação. Dor ou prurido no local da exposição podem ocorrer (JACKSON, 2008). À similaridade da raiva nos animais domésticos, a apresentação clínica em humanos é também dividida em duas formas: encefálica (furiosa), que corresponde 80% dos casos, e a paralítica, 20% dos casos (NOAH et al., 1998). Na forma encefálica episódios de hiperexcitabilidade separadas por intervalos de lucidez, disfunções autonômicas, com hipersalivação, arrepios, arritmias cardíacas, priapismo e hidrofobia (WARREL, 1976). A raiva paralítica caracteriza-se por fraqueza motora, que frequentemente inicia-se no sítio primário de exposição com progressão para tetraparesia (JACKSON, 2008). Apenas seis pacientes sobreviveram à infecção ao vírus da raiva (JACKSON, 2007).

## **2.6 Achados de Necropsia**

As lesões de raiva são, em geral, limitadas ao SNC e perceptíveis apenas na microscopia (JUBB; HUXTABLE, 1993). Os achados de necropsia não são específicos, entretanto, hiperemia de leptomeninges e lesões secundárias ao comprometimento neurológico como broncopneumonia por aspiração (disfagia neurológica), distensão da bexiga e do reto devido paralisia resultante de mielite viral, além de traumas auto-inflingidos, são possíveis achados em casos de raiva em herbívoros, porém nem sempre presentes (MORI; LEMOS, 1998; RECH et al., 2006, FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Hemorragias são, ocasionalmente, observadas macroscopicamente na medula espinhal de equinos e bovinos (MAXIE; YOUSSEF, 1993). Em monogástricos, evidências de ferimentos ou automutilação e corpos estranhos no estômago são indicativos de raiva (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

## **2.7 Histopatologia**

Na avaliação microscópica os achados característicos da raiva incluem meningoencefalite e meningomielite não supurativa, além de ganglioneurite cranioespinhal (JUBB; HUXTABLE, 1993; SWANEPOEL, 1994; LANGOHR et al., 2003). A alteração microscópica é caracterizada por infiltrado inflamatório de células mononucleares, principalmente de linfócitos, porém macrófagos e plasmócitos também poderão ser observados em menor número (GRAÇA et al., 2010). As células inflamatórias se dispõem ao redor de vasos e formam os referidos “manguitos perivascularres” (BARROS et al., 2006). Gliose com proliferação da micróglia, degeneração neuronal, satelitose e neuroniofagia, são, também, achados frequentes (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Langohr et al. (2003), através da análise histopatológica de 25 encéfalos de bovinos positivos para vírus da raiva, observou que as lesões ocasionadas pela enfermidade eram mais concentradas em tronco encefálico, cerebelo e medula espinhal. Os manguitos perivascularres foram mais evidentes na substância cinzenta e nos núcleos do tronco encefálico, afetando com maior frequência pequenos vasos. No telencéfalo, estes foram mais comuns na substância branca subcortical. Grande número de neurônios necróticos foi observado nas células de Purkinje do cerebelo, células piramidais do hipocampo e núcleos do tronco encefálico e da substância cinzenta da medula espinhal. Houve, ainda, em 68% dos casos analisados, corpúsculos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos (corpúsculo de Negri), especialmente nas células de Purkinje do cerebelo.

Esgongiose semelhante à observada nas encefalopatias espongiformes foi verificada em bovinos (FOLEY; ZACHARY, 1995). Essa lesão, inicialmente descrita em gambás (*Mephitis mephitis*) e raposas, foi observada também em ovinos, equinos e felinos naturalmente infectados (KING; TURNER, 1993). A intensidade das lesões na raiva são variáveis, entretanto, degeneração e necrose nunca são achados comuns (BARROS et al., 2006).

Os corpúsculos de Negri variam de tamanho (0,25-27 $\mu$ m) (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007; GRAÇA et al. 2010) e tendem a ocorrer mais frequentemente em grandes neurônios como neurônios piramidais do hipocampo, neurônios da medula oblongata e células de Purkinje do cerebelo. Da mesma forma, estão frequentemente presentes em neurônios não localizados em áreas de inflamação. Por esta razão, tecidos preconizados para diagnóstico de raiva sob microscopia e técnicas com anticorpos

fluorescentes são hipocampo, cerebelo, medula espinhal e gânglio trigeminal (ZACHARY, 2013). A frequência de aparecimento dos corpúsculos de Negri é inversamente proporcional ao grau de inflamação (BRAUND et al., 1987; MAXIE; YOUSSEF, 1993). Sua presença e concentração dependem do estágio e curso da doença, além da cepa viral e concentração do vírus (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Animais sacrificados em estágios precoces da doença, as lesões e corpúsculos de Negri podem não ser evidentes (RODRIGUEZ et al., 2007).

As lesões histológicas de raiva em equinos são semelhantes às observadas em bovinos, entretanto, vacuolização neuronal é visualizada com maior frequência e uma menor formação de corpúsculos de Negri (menos de 30%) é evidenciada (WILKINS; DELPIERO, 2007).

Em bovinos, caprinos, ovinos e equinos, lesões são mais proeminentes no tronco encefálico e medula, no entanto, lesões de cerebelo e cérebro são encontradas na maioria dos animais (LANGOHR et al., 2003; LIMA et al., 2005). Em caninos as lesões são observadas principalmente em tronco encefálico e hipocampo, podendo disseminar-se para a medula (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

## **2.8 Diagnóstico e Diagnóstico Diferencial**

O diagnóstico da raiva impescinde de suporte laboratorial, já que a doença apresenta diversos sinais clínicos (BRAUND et al., 1987) além de outras doenças neurológicas como diferenciais importantes. A rotina de diagnóstico é estabelecida por testes padrões como o isolamento viral, pesquisa de antígenos, ácidos nucleicos ou soroneutralização (SMITH, 1996; HANLON et al., 1999). O tecido de eleição para o diagnóstico de raiva é o encéfalo dos animais suspeitos. Em equinos, recomenda-se ainda, enviar ao laboratório fragmentos de medula espinhal (RODRIGUEZ et al., 2007).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) recomenda que a colheita do encéfalo seja realizada segundo o “Manual de Procedimentos para o Diagnóstico das Doenças do Sistema Nervoso Central de Bovinos” (BARROS; MARQUES, 2003), que requiere quatro fragmentos específicos para o exame virológico: cerebelo seccionado ao longo do verme; segmento de medula espinhal cervical; tálamo e parte caudal de um dos hemisférios telencefálicos. Estas quatro porções deverão ser



enviadas refrigeradas ou congeladas para o exame de imunofluorescência direta (IFD). Barros e Marques (2003) descrevem ainda que o material suspeito deverá, também, ser fixado em formalina a 10% e remetido para o exame histopatológico, incluindo tronco encefálico, cerebelo,  $\frac{3}{4}$  dos hemisférios telencefálicos, além do conjunto formado pela hipófise, *rete mirabile* e gânglios trigêmeos.

Em 1903, Adolchi Negri, forneceu a primeira descrição detalhada sob microscopia de luz da infecção pelo vírus da raiva (NEGRI, 1903). Descreveu a presença de corpúsculos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos em tecidos de animais infectados e durante décadas a presença deste corpúsculo foi considerada como evidência patológica definitiva para o diagnóstico da doença. Entretanto, com a sofisticação laboratorial e científica foi possível observar que os corpúsculos de Negri nem sempre estavam presentes nos tecidos afetados (VELLECA; FORRESTER, 1981). O desenvolvimento de técnicas de isolamento viral pôde correlacionar a existência de corpúsculos em 50-80% (UMOH et al., 1985; KOPROWSKI, 1996) nos casos positivos analisados. A visualização do corpúsculo de inclusão como determinante para o diagnóstico final é um método de baixa sensibilidade e especificidade (RODRIGUEZ et al., 2007), já que estes só podem ser observados em um número variável de animais. Além disso, fatores como a eutanásia do animal acometido, que abrevia o curso da doença, impedem a formação de corpúsculos de Negri, e ainda a deterioração do cadáver, que faz com que estes desapareçam em até seis horas após a morte (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

No Brasil o diagnóstico oficial é realizado pela prova de IFD e prova biológica (inoculação intracerebral em camundongos ou células) a partir de amostras de SNC de animais suspeitos (BRASIL, 2002). A IFD é, atualmente, o teste de escolha para o diagnóstico da raiva por apresentar uma sensibilidade de 80-100% (ZIMMER et al., 1990) e o recomendado pela Comissão Especialista em Raiva da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 1992; DEAN et al., 1996). Sua eficiência, no entanto, depende diretamente do treinamento do técnico de quem a exercerá, além da qualidade dos reagentes utilizados (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Este método pode ainda ser utilizado em tecidos de indivíduos vivos como impressões corneais, raspado de mucosa lingual, bulbo de folículos pilosos e cortes cutâneos congelados, entretanto, com limitada sensibilidade (ACHA; SZYFRES, 1986). A inoculação intracerebral em camundongos neonatos (ICC) é considerada a prova mais segura para o diagnóstico da

raiva (ZIMMER et al., 1990), mas possui como desvantagem o período de espera para o resultado final de pelo menos três semanas (BRAUND et al., 1987). Na ICC o material suspeito é inoculado por via intracerebral que desenvolvem sinais neurológicos e morrem entre oito a vinte e três dias após inoculação. A confirmação da *causa mortis* é feita através de nova IFD (RODRIGUEZ et al., 2007). De acordo com OMS, após exposição humana de risco, todas as amostras de SNC que resultaram negativo na IFD, deverão ser novamente testadas pela ICC (WHO, 1992). Alguns laboratórios, na tentativa de reduzir o número de animais experimentais utilizados, estão substituindo a inoculação em camundongos pela inoculação em cultivos celulares. As células de origem de rim de hamster e células de linhagens de neuroblastoma estão entre as mais utilizadas para este fim (RODRIGUEZ et al., 2007).

O exame de IHQ possibilita a detecção do antígeno viral em tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina (PALMER et al., 1995). Utiliza-se o anticorpo primário monoclonal ou policlonal específico para vírus da raiva e anticorpos conjugados com peroxidase ou avidina-biotina como anticorpos secundários. Kotwal e Narayan (1985) assim como Anjara e Jhala (1985) demonstraram que a técnica possui maior sensibilidade que o método de detecção do corpúsculo de Negri por HE além de se mostrar tão sensível quanto a IFD. Bourgon e Charlton (1987) reportaram que a IHQ pode ainda fornecer resultados superiores.

Métodos moleculares também vêm ganhando espaço no diagnóstico e caracterização do vírus da raiva nos últimos anos. A maior parte deles baseia-se na transcrição reversa de determinado segmento do genoma viral, seguido de amplificação pela reação da polimerase em cadeia (RT-PCR) (RODRIGUEZ et al., 2007). Têm sido utilizados para amplificar e sequenciar partes do genoma dos lyssavírus diretamente do encéfalo, saliva e de outros tecidos afetados (HEATON et al., 1997; SMITH, 1999), além disso foi capaz de diagnosticar a doença em encéfalos em decomposição que resultaram negativos na IFD e ICC (DAVID et al., 2002). O método de detecção de antígeno viral hibridização *in situ* é bem estabelecido e utiliza sondas que possuem por alvo o RNA genômico ou RNAm que codifica uma ou todas as proteínas do vírus (JACKSON; WUNNER, 1991).

O teste ELISA foi primariamente desenvolvido para realizar titulação de anticorpos em humanos e animais vacinados para vírus da raiva, mas foi modificado e atualmente pode, também, detectar antígenos a partir de amostras de sistema nervoso

(ATANASIU et al., 1980). Aglutinação em látex tem sido utilizada com sucesso para detectar o antígeno viral na saliva e encéfalo de cães infectados (KASEMPIMOLPORN et al., 2000).

O diagnóstico diferencial de raiva inclui doenças que cursam com sinais neurológicos como intoxicação por plantas hepatotóxicas que causam encefalopatia hepática, botulismo, febre catarral maligna, listeriose, tétano, encefalite por herpesvírus bovino tipo 5, polioencefalomalacia (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Em equinos deve-se diferenciar também das encefalomyelites virais dos equinos (BARROS, 2007) e da mieloencefalite por protozoários (RADOSTITIS et al., 2002).

## REFERÊNCIAS

ACHA P.N.; SZYFRES B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2 ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986. p. 502-506.

ANJARA, J.M.; JHALA, C.I. Immunoperoxidase reaction in diagnosis of rabies. **The International Journal of Zoonoses**, v.12, n.6, p. 267–275, 1985.

ARAI, YT, et al. New Lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.3, p. 333-337, 2003.

ATANASIU, P.; PERRIN, P.; DELAGNEAU, J.F. Use of enzyme immunoassay protein A for rabies antigen and antibody determination. **Developments in biological standardization**, v.46, p. 207-215, 1980.

BABES, V. **Traite de la Rage**. Paris: Bailliere et Fils, 1912.

BAER, G.M. et al. Rabies susceptibility and acetylcholine receptor. **Lancet**, v.335, n.8690, p. 664-665, 1990.

BAER, G.M. **The Natural history of rabies**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. 620p.

BAER, G.M.; NEVILLE, W.F.; TURNER, G.S. **Rabbis and Rabies: A Pictorial History through the Ages**. Mexico City: Laboratorios Baer, 1996. 133p.

BARROS, C.S.L. 2003. Comunicação pessoal (Universidade Federal de Santa Maria, RS).

BARROS, C.S.L.; MARQUES, G.H.F. **Procedimentos para o diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos**. Brasília: MAPA/SDA/DDA, 2003. 50p.

BARROS, C.S.L. et al. **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. São Paulo: Valée, 2006. 207p.

BARROS, C.S.L. Encefalomyelites virais dos Equinos. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. v.1, 3 ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. p.103-106.

BOURGON, A.R.; CHARLTON, K.M. The demonstration of rabies antigen in paraffin-embedded tissues using the peroxidase–antiperoxidase method: a comparative study. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.51, n.1, p. 117-120, 1987.

BRAVO, C. T. Investigación documental de la primera epidemia de rabia registrada en la Republica Mexicana en 1709. **Salud Publica de Mexico**, v.20, n.6, p. 705-716, 1978.

BRAUND, K.G. et al. Inflammatory, infectious, immune, parasitic and vascular diseases. In: OLIVER, J.E. et al. (Eds.). **Veterinary Neurology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1987. p. 254-266.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 05, 01 de março de 2002**. Aprovar as normas técnicas para o controle da raiva dos herbívoros domésticos. Disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=728>. Acesso em: 20 dez. 2014.

BRYCESON, A.D.M. et al. Demonstration during life of rabies antigen in humans. **Journal of Infectious Disease**, v.131, n.1, p. 71-74, 1975.

CONOMY, J.P. et al. Airborne rabies encephalitis: demonstration of rabies virus in the human central nervous system. **Neurology**, v.27, n.1, p. 67-69, 1977.

CONSTANTINE, D.G. Rabies transmission by air in bat caves. National Communicable Disease Center, Public Health Service Publication 1617. Washington: United States Government Printing Office, 1967. 51 p.

DAVID, D. et al. Rabies virus detection by RT-pcr in decomposed naturally infected brains. **Veterinary Microbiology**, v.87, n.2, p.111-118, 2002.

DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 88–95.

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

FEKADU, M. et al. Efficacy of rabies vaccines against Duvenhage virus isolated from European house bats (*Eptesicus serotinus*), classic rabies, and rabies-related viruses. **Vaccine**, v 6, n.6, p. 533, 1988.

FITZPATRICK, J.C. **Writings of George Washington**. Washington: US Government Printing Office, 1931.

FOLEY, G.L.; ZACHARY, J.F. Rabies-induced spongiform change and encephalitis in a heifer. **Veterinary Pathology**, v.32, n.3, p.309-311, 1995.

GALIZA, G.J.N. et al. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.3, p. 267-276, 2010.

GERMANO, P.M.L. Avanços na pesquisa da raiva. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n.1, p. 86-91, 1994.

GIBBONS, R.V. Cryptogenic rabies, bats, and the question of aerosol transmission. **Annals of Emergency Medicine**, v.39, n.5, p. 528-536, 2002.

GOMES, A.A.B. Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004**. 107f.

GRAÇA, D.L. et al. Patologia do Sistema Nervoso. In: SANTOS, R.L; ALESSI, A.C. (Ed.). **Patologia Veterinária**. São Paulo: Roca, 2010. p. 525-610.

GREEN, S.L. et al. Rabies in horses: 21 cases (1970-1990). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.200, n.8, p. 1123-1137, 1992.

HABEL, K.; KOPROWSKI, H. The laboratory data supporting the clinical trial of anti-rabies serum in persons bitten by a rabid wolf. **Bulletin of the World Health Organization**, v.13, n.5, p. 773-779, 1955.

HANLON, C.A.; SMITH, J.S.; ANDERSON, G.R. Recommendations of a national working group on prevention and control of rabies in the United States. Article II: Laboratory diagnosis of rabies. National Working Group on Rabies Prevention and Control. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n.11, p. 1444-1446, 1999.

HEATON, P.R. et al. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.11, p. 2762-2766, 1997.

HUDSON, L.C.; WEINSTOCK, D.; JORDAN, T. Clinical features of experimentally induced rabies in cattle and sheep. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v.43, n.2, p.85-95, 1996.

JACKSON, A.C.; WUNNER, W.H. Detection of rabies virus genomic RNA and mRNA in mouse and human brains by using in situ hybridization. **Journal of Virology**, v.65, n.6, p. 2839-2844, 1991.

JACKSON, A.C. Human disease. In: JACKSON, A.C.; WUNNER, W. H. (Eds.). **Rabies**. 2th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2007. p. 309-340.

JACKSON, A.C. Rabies. **Neurologic Clinics**, v.26, p. 717-726, 2008.

JOHNSON, A.L. Update on infectious diseases affecting the equine nervous system. **The Veterinary Clinics of North America**, v.27, n.3, p.573–587, 2011.

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. (Eds.). **Pathology of Domestic Animals**. v.1. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1993. Cap. 3, p. 267-437.

KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. Rabies. **Scientific American**, v.242, n.1, p. 120-134, 1980.

KASEMPIMOLPORN, S. et al. Human immune response to rabies nucleocapsid and glycoprotein antigens. **Clinical and Experimental Immunology**, v.84, n.2, p. 195-199, 1991.

KASEMPIMOLPORN, S. et al. Detection of rabies virus antigen in dog saliva using a latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.8, p. 3098-3099, 2000.

KING, A.A.; TURNER, G.S. Rabies: A review. **Journal of Comparative Pathology**, v.108, n.1, p. 1-39, 1993.

KOPROWSKI, H. La rage et la vaccination rabique de Pasteur a nos jours. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v.83, p. 301-308, 1985.

KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H. (Eds.). **Laboratory Techniques in Rabies**. 4<sup>th</sup> ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 80–97.

KOTWAL, S.; NARAYAN, K.G. Direct immunoperoxidase test in the diagnosis of rabies—an alternative to fluorescent antibody test. **The International Journal of Zoonoses**, v.12, n.1, p.80-85, 1985.

KNOBEL, D.L. et al. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. **Bulletin of the World Health Organization**, v.83, n.5, p. 321-400, 2005.

KRISTENSSON, K. et al. Rabies: interactions between neurons and viruses. A review of the history of Negri inclusion bodies. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.22, n.3, p. 179-187, 1996.

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

LENTZ, T.L. et al. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science**, v.215, n.4529, p. 182-184, 1982.

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, n.4, p. 250-264, 2005.

LYLES, D.S.; RUPPRECHT, C.E. Rhabdoviridae. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds.). **Fields Virology**. v.1. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: LWW, 2007. Cap. 39, p. 1363-1408.

MAXIE, M.G.; YOUSSEF, S. Nervous system, In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. (Eds). **Pathology of Domestic Animals**. v.1. 5<sup>th</sup> ed. St Louis: Mosby Elsevier, 2007. Cap. 3, p. 281-456.

MORI, A.E.; LEMOS, R.A.A. Raiva. In: LEMOS R.A.A. (Ed.). **Principais Enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul: reconhecimento e diagnóstico**. Campo Grande: Editora UFMS, 1998. p. 47-58.

NEGRI, A. Beitrag zum studium der aetiologie der Tollwut. **Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten**, v.43, p. 507-528, 1903.

NOAH, D.L., et al. The epidemiology of human rabies in the United States, 1980-1996. **Annals of Internal Medicine**, v.128, n.11, p. 922-930, 1998.

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, n.1, p. 283-286, 1995.

PEDROSO, P.M.O. et al. Aspectos clínico patológicos e imuno-histoquímicos de equídeos infectados pelo vírus da raiva. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.11, p. 909-914, 2010.

PEIXOTO, Z.M.P. et al. Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.1, p.72-75, 2000.

QUINN, P.J. et al. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2th ed. UK: Wiley-Blackwell, 2011. 912p.

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

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 do Mato Grosso do Sul, 2005, p.43-44.

REED, S. M. et al. Ataxia and paresis in horses. Part 1. Differential diagnosis. **The Compendium on Continuing Education**, v.3, p.88-99, 1981.

RIET-CORREA F. et al. 1999. Relatório das atividades e doenças da área de influência no período de 1978-1982. **Laboratório Regional de Diagnóstico**. Editora e Gráfica Universitária, Pelotas. 43p.

RODRIGUEZ, L. et al. Rhabdoviridae. In: FLORES, E.F. (Ed.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007. p. 689-719.

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

SINGH, K.B.; RATHOR, S.S.; BANSAL, B.K. Furious form of rabies in horses. **Equine Veterinary Science**, v.10, n.6, p. 431-432, 1990.

SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; LAHUNTA, A. **Veterinary Neuropathology**. Baltimore: Mosby, 1995. 527p.

SCHNEIDER, M.C. et al. Controle da raiva no Brasil de 1980 a 1990. **Revista de Saúde Pública**, v.30, n.2, p. 196-203, 1996.

SMITH, J.S. et al. Unexplained rabies in three immigrants in the United States: a virologic investigation. **New England Journal of Medicine**, v.324, p. 205-211, 1991.

SMITH, J.S. et al. Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.166, n.2, p. 296-307, 1992.

SMITH, J. S. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis and prevention of the disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, n.2, p. 166-176, 1996.

SMITH, J.S. Rabies virus. In: MURRAY, P.R. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 7<sup>th</sup> ed. Whashington: ASM Press, 1999. p. 1099-1106.

SMITH, M.O. Doenças do Sistema Nervoso. In: SMITH, B. P. (Ed.). **Medicina Interna de Grandes Animais**. 3ed. São Paulo: Manole, 2006. p. 873-1018.

STEELE, J. H.; FERNANDEZ, P.J. History of rabies and global aspects. In: BAER, G.M. (Ed.). **The natural history of rabies**. 2th ed. Boston: Boca Raton, 1991. Cap 8, p. 1-27.

SWANEPOEL, R. Rabies. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (Eds.). **Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa**. v.1. Cape Town: Oxford University Press, 1994. p. 493-552.

SWANEPOEL R. Rabies. In: COETZER J.A.W.; TUSTIN R.C. (Eds.). **Infectious Diseases of Livestock**. v.2. 2th ed. Cape Town: Oxford University Press, 2004. Cap. 99, p.1123-1182.

THÉODORIDES. **Histoire de la Rage**. Paris: Masson, 1986.



UMOH, J.U., EZEOKOLI, C.D., OKOH, A.E. Immunofluorescent staining of trypsinized formalin-fixed brain smears for rabies antigen: results compared with those obtained by standard methods for 221 suspect animal cases in Nigeria. **The Journal of Hygiene**, v. 94, p. 129–134, 1985.

VELLECA, W.M., FORRESTER, F.T. **Laboratory Methods for Detecting Rabies**. Washington: US Government Printing Office, 1981.

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

WARREL, D.A. The clinical picture of rabies in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, p. 188-195, 1976.

WILKINS, P.A.; DELPIERO, F. Rabies. In: SELTON, D.C; LONG, M.T. (Eds). **Equine Infectious Diseases**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. p. 185-191.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. In: Who Collaborating Centre for Rabies Surveillance & Research, ed. Rabies Bulletin Europe, v.10, n.4, p.1, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. In: Who Expert Committee on Rabies. 8<sup>th</sup> Report. Geneva: WHO, 1992.

ZACHARY, J. Sistema Nervoso. In: ZACHARY, J.; MCGAVIN, M.D. Bases da Patologia Veterinária. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 774-873.

ZIMMER, K. et al. Evaluation of five different methods for routine diagnosis of rabies. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v.37, p. 392-400, 1990.

## **ARTIGO**

Neste item é apresentado o artigo sobre o estudo histológico e imunohistoquímico das lesões ocasionadas pelo vírus da raiva em medula espinhal de bovinos e equinos.

## CARACTERIZAÇÃO DE LESÕES EM MEDULA ESPINHAL DE BOVINOS E EQUINOS COM RAIVA<sup>1</sup>

Daniele M. Bassuino<sup>2</sup>, Guilherme Konrad<sup>2</sup>, Raquel A.S. Cruz<sup>2</sup>, Gustavo S. Silva<sup>3</sup>  
Danilo C. Gomes<sup>4</sup>, Saulo P. Pavarini<sup>2</sup> & David Driemeier<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.** – BASSUINO, D.M., KONRADT, G., CRUZ, R.A.S., SILVA, G.S.GOMES, D.C., PAVARINI, S.P. & DRIEMEIER, D. [**Characterization of spinal cord lesions of cattle and horses with rabies**]. Caracterização de lesões em medula espinhal de bovinos e equinos com raiva. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

Between January 2013 and November 2014, 26 cattle and seven horses were diagnosed with rabies. Fragments of refrigerated brain and spinal cord were sent to apply the direct immunofluorescence (DIF) and the intracerebral inoculation in mice. Samples from the brain and spinal cord were collected and routinely processed for hematoxylin and eosin (HE) and immunohistochemistry (IHC). The spinal cord was sectioned at the cervical (C), cervical intumescence (CI), thoracic (T), lumbar (L), lumbar intumescence (LI) and sacral (S) portions to be evaluated. These were statistically analyzed with the IBM SPSS Statistics 18<sup>®</sup> software and with the Fisher test carried out with the Epi Info<sup>™</sup> 7.1.4 software. All the cattle and horses samples showed histologic lesions in the spinal cord. The inflammatory lesions in horses were discrete in the C and CI sections; moderate in the T, L and S; and accentuated in the LI. Gitter cells were discrete in C, CI and T; moderate in L and S; and accentuated in LI. IHC staining varied from moderate to accentuated. The bovine inflammatory lesions were moderate in all spinal cord sections and gitter cells were predominantly discrete. IHC staining was accentuated and homogenous in all spinal cord sections. Lesions in the T sections from horses were frequently observed; however, IHC staining revealed discrete variation between them. The lesions distribution from cattle samples highlighted variation only in the issue concerning malacia, which was frequently demonstrated in the L, LI and S sections. The Fisher test identified that the gathering of horses spinal cords allows a 3.5

---

<sup>1</sup> Recebido em .....

    Aceito para publicação em .....

    Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

<sup>2</sup> Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil. \*Autor para correspondência: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil.

<sup>4</sup> Laboratório de Anatomia Patológica (LAP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Filinto Müller 2443, Campo Grande, MS 79074-460, Brasil.

times higher chance of detection of rabies lesions than when compared to the individual analysis of the encephalon.

**INDEX TERMS:** Rabies, spinal cord, cattle, horse, histology, immunohistochemistry.

**RESUMO.** – No período entre janeiro de 2013 a novembro de 2014, 26 bovinos e sete equinos obtiveram o diagnóstico final de raiva. Fragmentos refrigerados de encéfalo e medula espinhal foram enviados para a realização das provas de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camundongos (ICC). Amostras de encéfalo e medula espinhal foram coletadas e processadas rotineiramente para hematoxilina e eosina (HE) e para o teste de imuno-histoquímica (IHQ). Para avaliação da medula espinhal, esta foi dividida nas porções cervical (C), intumescência cervical (IC), torácica (T), lombar (L), intumescência lombar (IL) e sacral (S) e analisada estatisticamente através do software IBM SPSS Statistics 18<sup>®</sup> e com o teste exato de Fisher pelo software Epi Info<sup>™</sup> 7.1.4. Todos os bovinos e equinos apresentaram lesões histológicas na medula espinhal. Nos equinos as lesões inflamatórias se revelaram discretas nas regiões C, IC; moderada em T, L e S e acentuada na secção de IL. Células gitter estiveram discretamente presentes em C, IC e T; em moderada quantidade nas regiões L e S e acentuada em IL. A marcação IHQ nos fragmentos medulares variou de moderada a acentuada. Nos bovinos as lesões inflamatórias foram moderadas em todos os segmentos medulares. Células gitter foram predominantemente discretas. A marcação IHQ foi acentuada e homogênea em todos os segmentos medulares. Nos equinos observou-se uma maior frequência de lesões a partir do segmento T, no entanto, a marcação IHQ revelou discreta variação entre os segmentos. Na distribuição lesional dos bovinos evidenciou-se variação apenas no quesito malacia, que se mostrou mais frequente nos segmentos L, IL e S. Identificou-se, com o método de Fisher, que a coleta da medula espinhal em equinos possibilita uma chance 3,5 vezes maior na detecção de lesões de raiva quando comparado à análise individual do encéfalo.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Raiva, medula espinhal, bovino, equino, histologia, imuno-histoquímica.

## INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença zoonótica (Summers et al. 1995), de notificação obrigatória, invariavelmente fatal, em animais afeta o sistema nervoso central (SNC) de pessoas e de quase todas as espécies de mamíferos domésticos e silvestres (Acha & Szyfres 1986, Barros et al. 2006). É causada por um vírus RNA, envelopado, altamente neurotrópico, da família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* (Radostitis et al. 2002, Swanepoel 2004). Sua ocorrência depende da existência de vetores na região (Radostits et al. 2002). Na América do Sul a raiva em herbívoros ocorre na forma de surtos e é geralmente transmitida pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Hudson et al. 1996, Barros et al. 2006). Todos os anos são notificados no Brasil, em média, 16 casos de raiva em humanos (Wada et al. 2011), e em bovinos calcula-se que ocorra uma perda anual de 842.000 animais (Lima et al. 2005, Carrieri et al. 2006).

O diagnóstico da raiva impescinde de suporte laboratorial, já que a doença apresenta diversos sinais clínicos, não apresenta lesões específicas durante a necropsia e possui uma diversidade de diagnósticos diferenciais (Braund et al. 1987). O material de eleição para o diagnóstico de raiva é o encéfalo dos animais suspeitos e em equinos, recomenda-se ainda, enviar ao laboratório fragmentos de medula espinhal (Rodriguez et al. 2007). No Brasil o diagnóstico oficial é realizado pela prova de imunofluorescência direta (IFD) (Brasil 2002). Segundo o “Manual de Procedimentos para o Diagnóstico das Doenças do Sistema Nervoso Central de Bovinos” descrito por Barros & Marques (2003), segmentos de cerebelo, medula espinhal cervical, tálamo e córtex telencefálico deverão ser refrigerados ou congelados para diagnóstico virológico de IFD; o restante fixado em formalina 10% e enviado para exame histopatológico. Apesar de apresentar alta eficiência para um diagnóstico rápido de raiva, a IFD possui alguns inconvenientes que incluem o custo do equipamento, exposição humana laboratorial ao vírus vivo e a necessidade de amostras frescas em adequadas condições que limitam a sua utilização (Last et al. 1994, Jogai et al. 2000, Arslan et al. 2004). A prova biológica (inoculação intracerebral em camundongos neonatos ou células - ICC) é considerada a prova mais segura para o diagnóstico de raiva (Zimmer et al. 1990), no entanto, possui como desvantagem o período de espera para o resultado final de pelo menos três semanas (Braund et al. 1987). O exame de imuno-histoquímica (IHQ) é um método sensível e específico para detecção do antígeno viral (Hamir et al. 1996), e pode, ainda, ser o teste

mais sensível, no caso de diagnóstico precoce, quando na histologia tradicional e na IFD ainda não é possível a detecção dos antígenos virais ou de lesões microscópicas características (Arslan et al. 2004, Woldehiwet 2005, Lembo et al. 2006).

A raiva pode cursar com uma forma furiosa e uma paralítica. A primeira relacionada a lesões cerebrais, e é mais observada em caninos. A forma paralítica está associada a lesões em medula espinhal e tronco encefálico, mais frequente em herbívoros (Fernandes & Riet-correa 2007). Os achados histológicos são variáveis e incluem meningoencefalite e meningomielite não supurativas com ganglioneurite como as principais lesões observadas (Jubb & Huxtable 1993). Inclusões intracitoplasmáticas acidofílicas, denominadas corpúsculos de Negri, são consideradas patognomônicas (Swanepoel 2004), entretanto, podem estar ausentes em 20-60% dos casos (Palmer et al. 1985, Last et al. 1994, Rupprecht et al. 2002, Nuovo et al. 2005). As lesões distribuem-se principalmente em tronco encefálico, cerebelo e medula espinhal (Langohr et al. 2003), hipocampo e gânglios trigeminais (Jones et al. 2000), e podem, ainda, variar de discretas a ausentes (Jubb & Huxtable 1993). O objetivo deste trabalho consiste na caracterização morfológica e imuno-histoquímica das lesões ocasionadas pelo vírus da raiva na medula espinhal de bovinos e equinos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

No período compreendido entre janeiro de 2013 a novembro de 2014 realizou-se necropsias e coletas de materiais provenientes de bovinos e equinos com síndrome neurológica. O diagnóstico final de raiva neste estudo foi determinado através de exames de histopatologia, IFD, ICC e/ou IHQ. Fragmentos de córtex telencefálico, tálamo, cerebelo, medula oblonga, juntamente com medula espinhal nas porções cervical, torácica, lombar e sacral foram mantidos refrigerados e enviados para realização do exame de IFD; os resultados negativos no teste de IFD foram submetidos à prova biológica para confirmação. O restante do material foi fixado em formalina tamponada a 10% e após 24-48 horas de fixação, foram clivados de forma padronizada. O encéfalo foi subdividido em córtex telencefálico (CT), tálamo (TA), hipocampo (HC), cerebelo (CE) e óbex (OB). A medula espinhal foi dividida nas regiões cervical (C), intumescência cervical (IC), torácica (T), lombar (L), intumescência lombar (IL) e sacral (S). O material foi processado rotineiramente para exame histopatológico,

incluído em parafina, cortado a 3 µm de espessura e corado por hematoxilina e eosina (HE).

O exame de IHQ foi realizado na medula espinhal de todos os animais, a partir de protocolo pré-estabelecido (Pedroso et al. 2008). Como anticorpo primário utilizou-se o anticorpo primário policlonal (Rabies Polyclonal DFA, Chemicon #5199, Temecula, CA, Estados Unidos) na diluição de 1:1000 em PBS (*phosphate buffered saline*) e revelado com cromógeno vermelho (AEC, Dako North America, Carpinteria, USA e VECTOR®NovaRED, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

As lesões foram pesquisadas em microscopia de luz e, quando existentes, foram classificadas quantitativamente e qualitativamente.

Na análise estatística dos dados, todas as informações obtidas no levantamento realizado nos exames laboratoriais foram transcritas para um banco de dados no software Microsoft Excel 2010. As estatísticas descritivas foram feitas no software IBM SPSS Statistics 18<sup>®</sup> e a partir do banco de dados foram obtidas as principais características, evidenciando-as através de tabelas, gráficos e resumos numéricos.

Para melhor qualificação do grau de severidade das lesões observadas criou-se um índice de severidade de lesões. O índice foi baseado na soma dos graus das lesões de todos os animais por segmento da medula espinhal (1: discreta; 2: moderada; 3: acentuada) e posteriormente dividido pelo número total de animais de cada espécie. O índice gerado agrupou as seguintes classificações: manguitos perivasculares + microgliose + neuroniofagia, e analisou separadamente a presença de células gitter e a intensidade de marcação IHQ. Através desse cálculo foi possível obter uma classificação quantitativa da severidade das lesões, por localidade, de acordo com a faixa de abrangência do resultado (1-3: discreta; 4-6: moderada; 7-9: acentuada). De maneira semelhante interpretou-se os resultados gerados da análise de presença de células gitter e de marcação IHQ que obtiveram uma variação de 0 a 3.

Para avaliação do risco relativo entre a presença ou ausência de lesão entre os dois locais analisados neste estudo (encéfalo e medula espinhal) utilizou-se o teste exato de Fisher com nível de significância de 5% através do software Epi Info<sup>™</sup> 7.1.4.

## RESULTADOS

No período deste estudo foram realizadas 222 necropsias de bovinos e 111 de equinos, destes, 26 bovinos (12%) (Fig. 1A) e sete equinos (6%) (Fig. 1B) foram diagnosticados como raiva no final deste período, totalizando 33 amostras para a realização deste trabalho.

Na necropsia, bexiga acentuadamente distendida (Fig. 1C) e repleção de ampola retal contendo fezes ressequidas (Fig. 1D) foram observadas na maioria dos animais necropsiados neste período. Além disso, hiperemia de vasos de leptomeninge e áreas multifocais de hemorragia distribuídas principalmente na substância cinzenta da medula espinhal dos equinos (Fig. 1F), e em menor número e intensidade, nos bovinos (Fig. 1E), foram também achados macroscópios relevantes.

Na análise histológica apenas dois equinos apresentaram lesões no encéfalo, localizadas principalmente nos segmentos de OB e CE. As lesões caracterizavam-se por áreas multifocais discretas a acentuadas de infiltrado inflamatório composto por sua maioria de linfócitos e em menor quantidade plasmócitos e macrófagos ao redor de vasos, denominados manguitos perivasculares. Além disso, apresentaram microgliose multifocal moderada com neuroniofagia discreta e leptomeningite linfoplasmocitária. Corpúsculos de inclusão não foram observados em nenhuma região do encéfalo dos equinos. Lesões em diferentes graus foram observadas no encéfalo de 25 bovinos (96,1%); as secções de OB (23/26) e CE (21/26) foram mais severamente acometidas, seguidas de TA (11/26), HC (9/26) e CT (8/26). Leptomeningite (73%) foi observada de maneira predominante em região cerebelar; além disso, manguitos perivasculares linfoplasmocitários (92%), microgliose nodular (92%), por vezes formando grandes nódulos gliais e neuroniofagia (42%) foram, também, achados microscópicos importantes. Corpúsculos de Negri foram observados em doze casos (46%).

À avaliação da medula espinhal todos os bovinos e equinos apresentaram lesões histológicas. No entanto, corpúsculo de Negri foi observado em apenas dois equinos (28,5%) nos segmentos L e IL, e em 19 bovinos (73%) (Fig. 5D). Além disso, todos os equinos apresentaram na medula espinhal áreas multifocais de hemorragia que variaram de intensidade discreta a moderada (Fig. 3A).

Na Figura 2 estão representadas as lesões inflamatórias observadas na medula espinhal de equinos, nas quais se revelaram discretas nas regiões C, IC; moderada em T,



L e S e acentuada na secção de IL (Fig. 3B e C). De maneira semelhante, observou-se que as células gitter, estiveram discretamente presentes em C, IC e T; em moderada quantidade nas regiões L e S e acentuada em IL (Fig. 3D). A marcação IHQ nos fragmentos medulares variou de moderada a acentuada (Fig. 3E e F). Na avaliação do índice de severidade das lesões na medula espinhal de bovinos (Fig. 4), as lesões inflamatórias foram observadas de maneira moderada em todos os segmentos medulares (Fig. 5A e B). Além disso, diferente do observado nos equinos, células gitter foram detectadas de maneira discreta em todas as secções medulares avaliadas, exceto na região S (Fig. 5C), onde se mostrou moderada. A marcação imuno-histoquímica na medula dos bovinos foi acentuada e homogênea em todos os segmentos medulares (Fig. 5E).

A frequência da ocorrência das lesões por segmento da medula espinhal foi disposta nas tabelas 1 e 2. Nos equinos observou-se uma maior frequência de lesões a partir do segmento T, independente do grau de severidade, no entanto, a marcação imuno-histoquímica revelou discreta variação entre os segmentos (Tabela 1). Na distribuição lesional dos bovinos (Tabela 2) evidenciou-se variação apenas no quesito malacia, que se mostrou mais frequente nos segmentos L, IL e S, os demais valores se mostraram homogêneos entre as regiões medulares, inclusive na marcação IHQ.

Todos os casos obtiveram imunomarcação positiva no exame de IHQ (100%), que demonstrou marcação no pericário (Fig. 5F), axônio e dendritos de neurônios íntegros ou com neuroniofagia, como agregados de grânulos ou em formações arredondadas, associado a números variáveis de corpúsculos de inclusão virais. Na IFD dois equinos foram positivos (28,5%). Todos os resultados negativos na IFD foram negativos no exame de ICC. Nos bovinos, a IFD foi positiva em 20 casos (76,9%). Os resultados negativos foram submetidos ao teste confirmatório de ICC, onde gerou cinco resultados negativos e um positivo para o vírus da raiva.

Com os dados analíticos realizou-se o teste exato de Fisher a 5% de significância e identificou-se que a coleta da medula espinhal em equinos possibilita uma chance 3,5 vezes maior na detecção de lesões de raiva quando comparado à análise individual do encéfalo. Em bovinos tal diferença não foi observada, pois a frequência de lesões observadas no encéfalo e na medula espinhal foi semelhante.

## DISCUSSÃO

O diagnóstico de raiva nestes casos baseou-se nos achados de necropsia, nas lesões histopatológicas, resultados de IFD, IHQ e/ou ICC.

Os achados de necropsia em casos de raiva, geralmente, não são significantes, entretanto, hiperemia de leptomeninges e lesões secundárias ao comprometimento neurológico como broncopneumonia por aspiração, distensão da bexiga e do reto, devido paralisia resultante de mielite viral, além de traumas auto-inflingidos, são possíveis achados em casos de raiva. Além disso, hemorragias são ocasionalmente observadas macroscopicamente na medula espinhal de equinos e bovinos (Maxie & Youssef 1993). O descrito na literatura corrobora com o observado neste trabalho; porém, tais alterações, nem sempre estão presentes (Mori & Lemos 1998, Rech et al. 2006, Fernandes & Riet-correa 2007). As lesões microscópicas observadas neste estudo, caracterizadas por meningoencefalite e meningomielite não supurativa com focos de gliose, necrose neuronal e neuroniofagia, associado à presença de corpúsculos de Negri, foram similares às descritas por outros autores (Lima et al. 2005, Maxie & Youssef 2007, Marcolongo-Pereira et al. 2011). Neste estudo 100% dos bovinos e equinos apresentaram lesões medulares, seguidas das regiões de tronco encefálico e cerebelo. Nos equinos uma maior frequência de lesões na medula espinhal foi observada nos segmentos L, IL caracterizadas por inflamação moderada a acentuada composta por denso infiltrado perivascular linfoplasmocitário, microgliose nodular a difusa, com perda neuronal, neuroniofagia e proeminente presença de células gitter. Na substância branca da medula espinhal de alguns casos encontrou-se extensão do infiltrado perivascular linfoplasmocitário ao longo dos espaços vasculares. Uma maior proeminência dessas lesões nos segmentos lombares foi também constatado por Chopra et al. (1980) em um estudo histopatológico de raiva parálitica em humanos. Em bovinos, através da determinação da frequência das lesões, verificou-se uma distribuição de lesões inflamatórias presentes em todos os seguimentos medulares de forma homogênea; entretanto áreas de malacia foram mais observadas nas regiões L, IL e S, de intensidade predominantemente discreta, divergindo do observado na medula espinhal de equinos. Esta distribuição apresentada em equinos e bovinos pode ser explicada pela progressão centrípeta do vírus, que se transporta através da medula espinhal até o encéfalo (Jackson 2002, Swanepoel 2004, Dietzschold et al. 2005). Além

disso, áreas de hemorragia multifocal na medula espinhal foram observados em todos os equinos, algumas destas visualizadas macroscopicamente, resultado que corrobora com o observado por Hamir et al. (1992) e superior ao encontrado por Pedroso et al. (2010), que visualizou hemorragia em apenas um equino.

Corpúsculos de Negri, apesar de característicos da doença, não são evidentes em todos os casos (Jubb & Huxtable 1993). Neste estudo foram detectados com maior frequência nos segmentos da medula espinhal de bovinos (73%) e equinos (28,5%) quando comparados à análise dos fragmentos encefálicos. Sua presença está correlacionada com estágio e curso clínico da doença, além da cepa viral e concentração vírica (Fernandes & Riet-Correa 2007, Maxie & Youssef 2007).

De acordo com Silva et al (1974) a detecção do vírus da raiva em equinos poderá ser improdutiva quando o agente é pesquisado somente em cérebro e cerebelo. Esses autores mencionam dois casos em que o antígeno viral foi observado apenas na medula espinhal e medula oblonga. A análise estatística e comparativa entre medula espinhal e cérebro e cerebelo deste estudo identificou que uma coleta amostral correta para o diagnóstico da raiva na espécie equina infere em uma importância de 3,5 vezes, já que apenas dois equinos apresentaram lesões encefálicas.

A sensibilidade do diagnóstico da raiva utilizando-se a técnica de IFD e IHQ aproxima-se dos 98% (ZIMMER et al. 1990). O exame de IHQ deste estudo demonstrou o antígeno viral em todos os 33 casos, semelhante ao observado por Stein et al. (2010) o qual observou marcação do antígeno viral nos 39 casos analisados; entretanto, no presente estudo 22 casos (66,6%) foram positivos na IFD, resultados semelhantes ao observado por Pedroso et al. (2010) que encontrou 55% de amostras positivas no teste de IFD nos equinos diagnosticados com vírus da raiva. Esses dados tornam evidente que uma concordância completa entre os testes pode não ocorrer em todas as amostras (ZIMMER et al. 1990). Essa divergência poderá ser atribuída ao estado de conservação da amostra, como o observado por Carvalho (2001) que encontrou uma sensibilidade de 73% em materiais em decomposição; além disso, reações individuais à doença, período de incubação e a evolução do quadro clínico também são citados como fatores influentes (Germano et al. 1977). Esses resultados demonstram a importância da IHQ como diagnóstico auxiliar, especialmente nos casos em que a IFD resulta negativa. Nas últimas duas décadas a IHQ tem se tornado muito popular por ter a capacidade de detectar antígenos em tecidos fixados (Last et al. 1994,

Jogai et al. 2000, Rupprecht et al. 2001). Alguns estudos demonstram que a sensibilidade da IHQ para o diagnóstico da raiva é semelhante ao IFD (Palmer et al. 1985, Woldehiwet 2005), mas que pode ainda ser mais sensível no caso de diagnósticos precoces, quando a histopatologia tradicional e a técnica de IFD ainda não são capazes de detectar antígenos virais ou lesões características da doença (Arslan et al. 2004, Woldehiwet 2005, Lembo et al. 2006).

A frequência de raiva em bovinos encontrada no período analisado foi alta e correspondeu a 12% de todos os diagnósticos concluídos no intervalo deste trabalho; resultado semelhante foi observado por Lemos (2005) no estado do Mato Grosso do Sul, e superior aos descritos por outros autores em estudos retrospectivos realizados no Rio Grande do Sul, o qual Riet-Correa et al. (1999) registraram um total de 2%, similar ao observado por Sanches et al. (2000) que atribuíram 2,5% das mortes de bovinos em 36 anos analisados ao vírus da raiva. A raiva em equinos é uma doença pouco estudada no Brasil (Lima et al. 2005) e de apresentação clínica indistinguível de outras encefalites (Green et al. 1992, Keane & Little 1997). Peixoto et al. (2000) relata que as amostras provenientes de equinos para o diagnóstico de raiva diferem das observadas em outras espécies. Demonstra, ainda, que os testes de IFD e de pesquisa de corpúsculos de Negri para o diagnóstico da doença, obtiveram menor sensibilidade, com diferença estatística significativa quando comparados com a espécie bovina. Ao considerar a população de equinos necropsiada no período deste trabalho, sugere-se que a raiva nesta espécie é tão frequente quanto em bovinos, o que ressalta a importância de uma correta coleta de material para a obtenção de um diagnóstico preciso para esta espécie.

## REFERÊNCIAS

- Acha P.N. & Szyfres B. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2 ed. Organización Panamericana de la Salud, Washington, p.502-526.
- Arslan A., Saglam Y.S. & Temur A. 2004. Detection of rabies viral antigens in non-autolysed and autolysed tissues by using an immunoperoxidase technique. *Vet. Rec.* 155:550-552.
- Barros C.S.L. & Marques G.H.F. 2003. Procedimentos para o diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos. Brasília: MAPA/SDA/DDA, 50p.
- Barros C.S.L., Driemeier D., Dutra I.S. & Lemos R.A.A. 2006. Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil. Vallée, São Paulo, p. 21-28.
- Braund K.G., Brewer B.D. & Mayhew I.G. 1987. Inflammatory, infectious, immune, parasitic and vascular diseases, p. 254-266. In: Oliver J.E., Horlein B.F. & Mayhew I.G. (Ed.), *Veterinary Neurology*. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 05, 01 de março de 2002. Aprovar as normas técnicas para o controle da raiva dos herbívoros domésticos. Disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=728>. Acesso em: 20 dez. 2014.
- Carrieri M.L., Peixoto Z.M.P., Paciencia M.L.B., Kotait I. & Germano P.M.L. 2006. Laboratory diagnosis of equine rabies and its implications for human postexposure prophylaxis. *J. Virol. Meth.* 138:1-9.
- Carvalho A.A.B. 2001. Sistema alternativo para o diagnóstico da raiva utilizando células de neuroblastoma murino: testes com amostras de campo isoladas no Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 105p.
- Chopra J.S., Banerjee J.M., Murthy M.K. & Pal S.R. 1980. Paralytic rabies a clinico-pathological study. *Brain.* 103:789-802.
- Dietzschold B., Schnell M. & Koprowski H. 2005. Pathogenesis of rabies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 292: 45-56.
- Fernandes C.G. & Riet-Correa F. 2007. Raiva, p.184-198. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Vol.1. Pallotti, Santa Maria.
- Germano P.M.L., Miguel O. & Chamelet E.L.B. 1977. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos, aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina. *Revta. Fac. Med. Vet. Univ. São Paulo.* 14(1): 133-141.
- Green S.L., Smith L.L., Vernau W. & Beacock S.M. 1992. Rabies in horses: 21 cases (1970-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200:1133-1137.
- Hamir A. N., Moser G. & Rupprecht C. E. 1992. A Five Year (1985-1989) Retrospective Study of Equine Neurological Diseases with Special Reference to Rabies. *J. Comp. Path.* 106: 411-421.
- Hamir A.N., Moser G., Wampler T., Haltel A., Dietzschold B. & Rupprecht C.E. 1996. Use of a single anti-nucleocapsid monoclonal antibody to detect rabies antigen in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet. Rec.* 138(5):114-115.
- Hudson L.C., Weinstock D. & Jordan T. 1996. Clinical features of experimentally induced rabies in cattle and sheep. *J. Vet. Med. B.* 43(2): 85-95.
- Jackson A. C. 2002. Update on rabies. *Curr. Opin. Neurol.* 15:327-331.

- Jogai S., Radotra B.D. & Banerjee A.K. 2000. Immunohistochemical study of human rabies. *Neuropathology*. 20:197–203.
- Jones T.C., Hunt R.D. & King N.W. 2000. *Patologia Veterinária*. 6 ed. Manole, Barueri. 1415p.
- Jubb K.V.F. & Huxtable C.R. 1993. The nervous system, p.267-439. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (Ed.), *Pathology of Domestic Animals*. Vol. 1. 4a ed. Academic Press, San Diego.
- Keane D.P. & Little P.B. 1987. Equine viral encephalomyelitis in Canada: A review of known and potential causes. *Can. Vet. J.* 28(8):497-504.
- Langohr I.M., Irigoyen L.F., Lemos R.A.A. & Barros C.S.L. 2003. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. *Ciência Rural*. 33:125-131.
- Last R.D., Jardine J.E., Smit M.M.E. & Van Der Lugt J.J. 1994. Application of immunoperoxidase techniques to formalin-fixed brain tissue for the diagnosis of rabies in southern Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 61:183–187.
- Lemos R.A.A. 2005. *Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões centro-oeste e sudeste do Brasil*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 155p.
- Lembo T., Niezgodna M., Velasco-Villa A., Cleaveland S., Ernest E. & Rupprecht C.E. 2006. Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. *Emerg. Infect. Dis.* 12:310–313.
- Lima E.F., Riet-Correa F., Castro R.S., Gomes A.A.B. & Lima F.S. 2005. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 25(4):250-264.
- Marcolongo-Pereira C., Sallis E.S.V., Grecco F.B., Raffi M.B., Soares M.P & Schild A.L. 2011. Raiva em bovinos na Região Sul do Rio Grande do Sul: epidemiologia e diagnóstico imuno-histoquímico. *Pesq. Vet. Bras.* 31(4):331-335.
- Maxie M.G., Youssef S. 2007. The nervous system, p.283-455. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer's *Pathology of Domestic Animals*. Vol.1. 5th ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Mori A.E. & Lemos R.A.A. 1998. Raiva, p. 47-58. In: Lemos R.A.A. (Ed.), *Principais Enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul: reconhecimento e diagnóstico*. Editora UFMS, Campo Grande.
- Nuovo G.R., DeFaria D.L., Chanona-Vilchi J.G. & Zhang Y. 2005. Molecular detection of rabies encephalitis and correlation with cytokine expression. *Modern. Pathol.* 18:62–67.
- Palmer D.G., Ossent P., Suter M.M. & Ferrari E. 1985. Demonstration of rabies viral antigen in paraffin tissue sections: comparison of the immunofluorescence technique with the unlabeled antibody enzyme method. *Am. J. Vet. Res.* 46:283–286.
- Pedroso P.M.O., Pescador C.A., Bandarra P.M., Raymundo D.L., Borba M.R., Wouters F., Bezerra Jr P.S. & Driemeier D. 2008. 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. *Pesq. Vet. Bras.* 28(12):627-632.
- Pedroso P.M.O., Colodel E.M., Gomes D.C., Varaschin M.S., Bezerra Jr P.S., Barbosa J.D., Tokarnia C.H. & Driemeier D. 2010. Aspectos clínico-patológicos e imuno-histoquímicos de equídeos infectados pelo vírus da raiva. *Pesq. Vet. Bras.* 30(11):909-914.
- Peixoto Z.M.P., Cunha E.M.S., Sacramento D.R.V., Souza M.C.A.M., Silva L.H.Q., Germano P.L., Kroeff S.S. & Kotait I. 2000. Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. *Braz. J. Microbiol.* 31:72-75.

- Radostitis O.M., Gay C.C. & Hinchcliff K.W. 2002. *Clínica Veterinária*. 9ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.1077-1083.
- Rech R.R., Rissi D.R., Pierezan F., Inkelmann M.A. & Barros C.S.L. 2006. Raiva em herbívoros: 27 casos. *Anais Encontro Nacional de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário (Endivet)*, Campo Grande, MS, p.43-44.
- Riet-Correa F., Ferreira J. L.M. & Schild A.L. 1999. Relatório das atividades e doenças da área de influência no período de 1978-1982. Laboratório Regional de Diagnóstico. Editora e Gráfica Universitária, Pelotas. 43p.
- Rodriguez L.L., Roehe P.M., Batista H. & Kurath G. 2007. Rhabdoviridae, p.691-718. In: Flores E.F. (Ed.), *Virologia Veterinária*. UFSM, Santa Maria.
- Rupprecht C.E., Stohr K. & Meredith C. 2001. Rabies, p. 3–36. In: Williams E.S. & Barker I.K. (Eds), *Infectious Diseases of Wild Mammals*. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell, Ames, IA.
- Rupprecht C.E., Hanlon C.A. & Hemachudha T. 2002. Rabies re-examined. *Lancet. Infect. Dis.* 2:327–343.
- Sanches A.W.D., Langohr I.M., Stigger A.L. & Barros S.L.B. 2000. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 20(3):113-118.
- Silva R.A., Silva N.M. & Menezes P.R.V. 1974. Ocorrência do vírus da raiva na medula e no bulbo de eqüinos na doença natural e sua ausência nas diferentes regiões do sistema nervoso central e outros tecidos. *Pesq. Agrop. Bras. Sér. Vet.* 9:29-31.
- Summers B.A., Cummings J.F. & Lahunta A. 1995. *Veterinary Neuropathology*. Mosby, Baltimore, p.95-99.
- Stein L.T., Rech R.R., Harrison L. & Brown C.C. 2010. Immunohistochemical study of rabies virus within the central nervous system of domestic and wildlife species. *Vet. Pathol.* 47(4):630-636.
- Swanepoel R. 2004. Rabies, p.1123-1182. In: Coetzer J.A.W.; Tustin R.C. (Ed.), *Infectious Diseases of Livestock*. v.2. 2th ed. Oxford University Press, Cape Town.
- Wada M.Y., Rocha S. M., Maia-Elkhoury A.N.S. 2011. Situação da Raiva no Brasil, 2000 a 2009. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 20(4):509-518.
- Woldehiwet Z. 2005. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. *Clin Chim Acta.* 351:49–63.
- Zimmer K., Wiegand D., Manz D., Frost J.W., Reinacher M. & Frese K. 1990. Evaluation of five different methods for routine diagnosis of rabies. *J. Vet. Med. B* 37:392-400.

### Legendas das Figuras

**Fig.1. Caracterização clínico-patológica da raiva em bovinos e eqüinos:** **A. Bovino:** paralisia de membros pélvicos. **B. Equino:** paralisia de membros pélvicos. **C. Bovino, bexiga:** acentuadamente distendida. **D. Equino, intestino grosso:** repleto com fezes ressequidas. **E. Bovino, medula espinhal:** intumescência cervical, áreas de hemorragia em substância cinzenta. **F. Equino, medula espinhal:** intumescência cervical, áreas de hemorragia em substância branca e cinzenta.

**Fig. 2. Medula espinhal eqüinos - índice de classificação de severidade:** **A.** Lesões inflamatórias (manguitos perivascularares, microgliose, neuroniofagia). **B.** Presença de células gitter. **C.** Marcação imuno-histoquímica.

**Fig. 3. Caracterização das lesões histológicas e imuno-histoquímicas em medula espinhal de equinos com raiva:** **A. Intumescência lombar:** visualizam-se manguitos perivasculares linfoplasmocitário multifocal acentuado associado a áreas multifocais de hemorragia, Obj. 10x, HE. **B. Intumescência lombar:** observa-se manguitos perivasculares linfoplasmocitário multifocal acentuado associado a microgliose multifocal, Obj. 20x, HE. **C. Lombar:** neuroniofagia acentuada, Obj. 40x, HE. **D. Intumescência lombar:** grande quantidade de células gitter, além de manguito perivascular linfoplasmocitário, Obj. 20x, HE. **E. Lombar:** imunomarcção acentuada de neurônios e seus prolongamentos, Obj. 20x, Vector®NovaRED. **F. Sacral:** imunomarcção positiva em neurônio, Obj. 40x, Vector®NovaRED.

**Fig. 4. Medula espinhal bovinos - índice de classificação de severidade:** **A.** Lesões inflamatórias (manguitos perivasculares, microgliose, neuroniofagia). **B.** Presença de células gitter. **C.** Marcação imunohistoquímica.

**Fig. 5. Caracterização das lesões histológicas e imuno-histoquímicas em medula espinhal de bovinos com raiva:** **A. Intumescência lombar:** visualizam-se manguitos perivasculares linfoplasmocitário multifocal moderado, Obj. 4x, HE. **B. Sacral:** observa-se acentuada neuroniofagia, Obj. 40x, HE. **C. Sacral:** grande quantidade de células gitter, Obj. 40x, HE. **D. Lombar:** corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico (Corpúsculo de Negri), Obj. 40x, HE. **E. Cervical:** imunomarcção acentuada de neurônios e seus prolongamentos, Obj. 20x, AEC. **F. Torácica:** imunomarcção positiva do pericário neuronal, Obj. 40x, AEC.

**Tabela 1** Frequência da ocorrência de lesões e de marcação imuno-histoquímica por localização nas secções medulares de equinos

| Local | Manguitos perivasculares, microgliose, neuroniofagia | Células Gitter | IHQ |
|-------|--|----------------|-----|
| C     | 8%   | 9%             | 14% |
| IC    | 13%  | 9%             | 17% |
| T     | 19%  | 18%            | 19% |
| L     | 23%  | 18%            | 19% |
| IL    | 22%  | 27%            | 17% |
| S     | 14%  | 18%            | 14% |

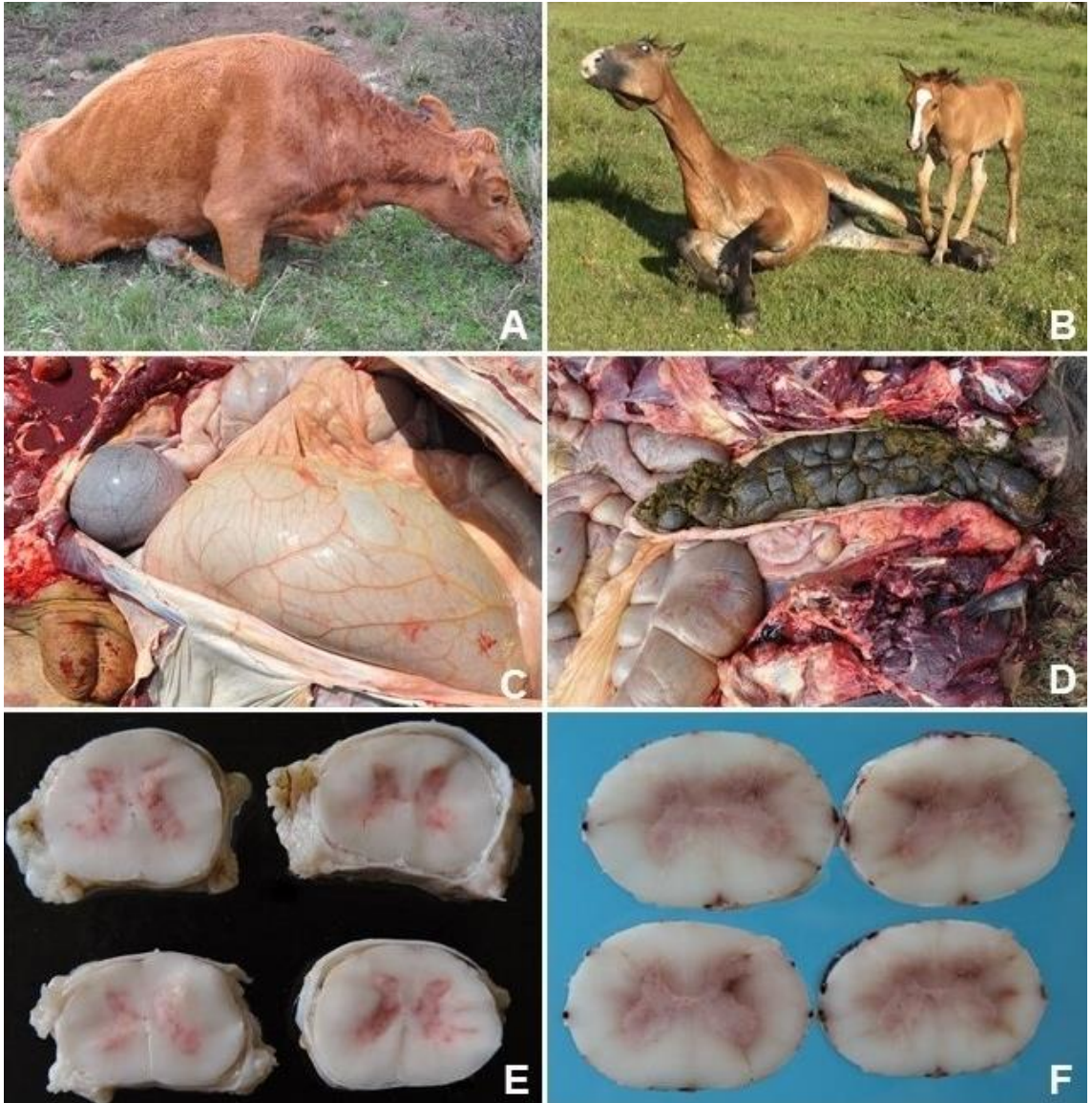
C: cervical; IC: intumescência cervical; T: torácica; L: lombar; IL: intumescência lombar; S: sacral



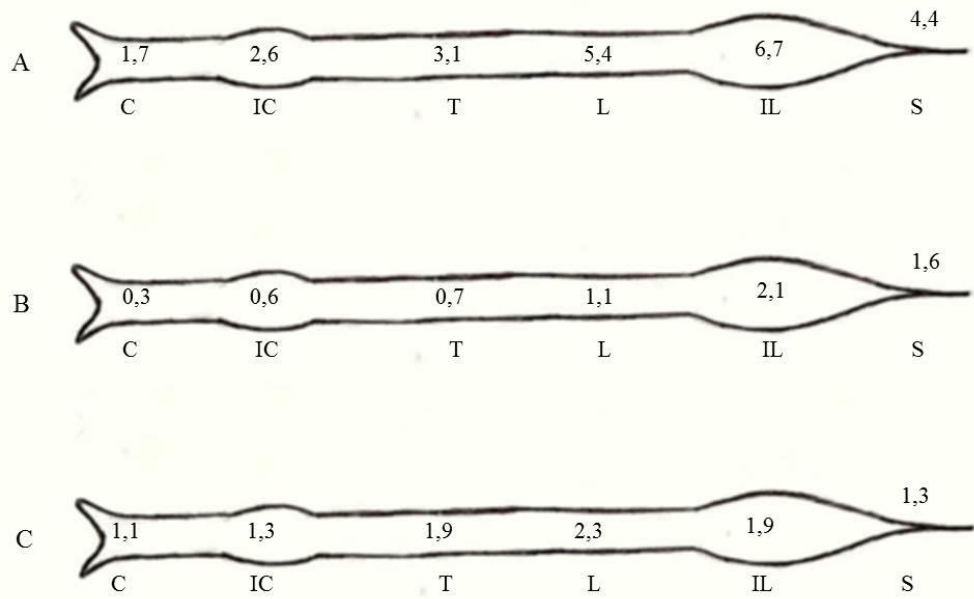
**Tabela 2** Frequência da ocorrência de lesões e de marcação imuno-histoquímica por localização nas secções medulares de bovinos

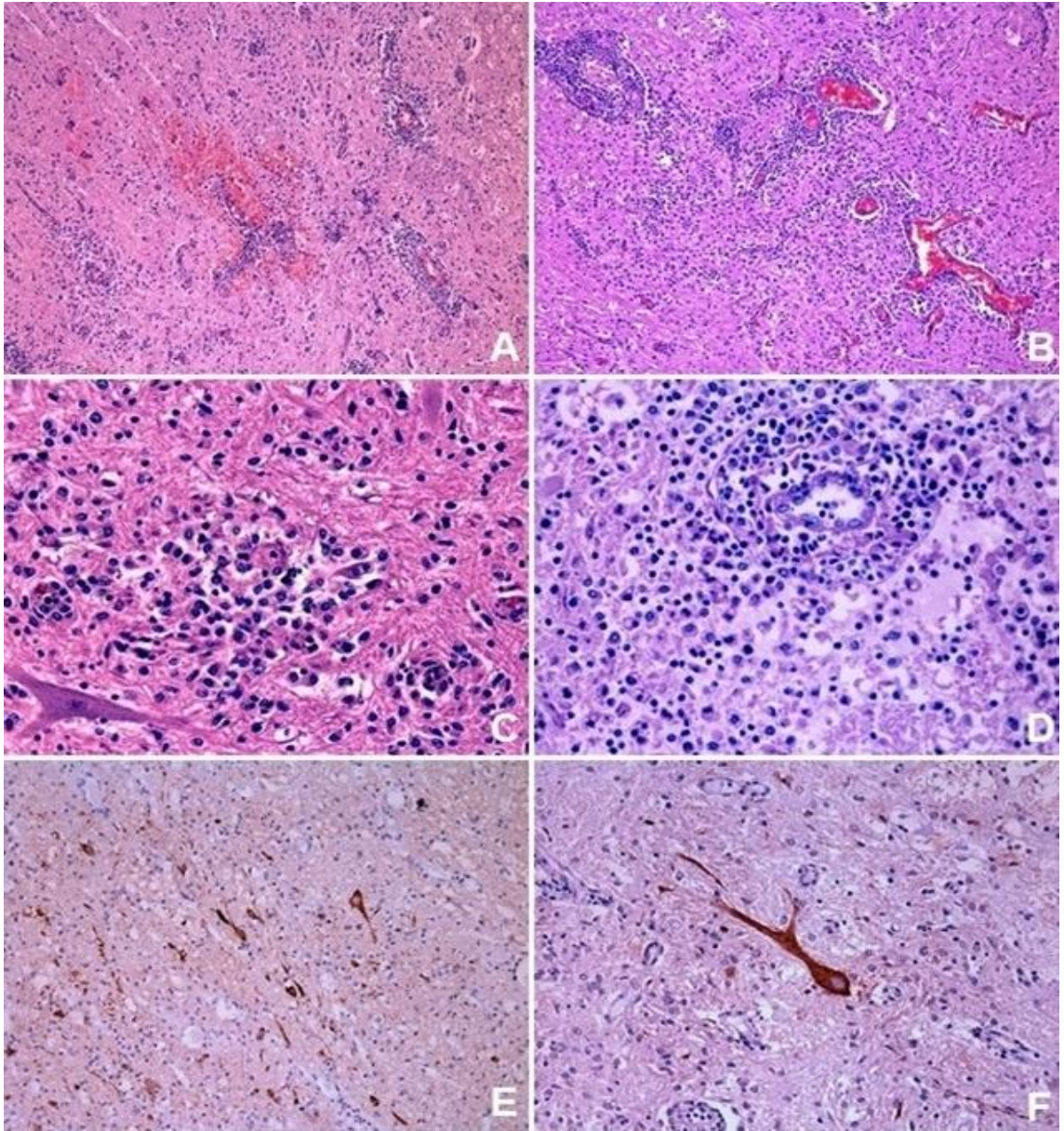
| <b>Local</b> | <b>Manguitos perivascularares,<br/>microgliose, neuroniofagia</b> | <b>Células Gitter</b> | <b>IHQ</b> |
|--------------|---|-----------------------|------------|
| <b>C</b>     | 15%   | 7%                    | 17%        |
| <b>IC</b>    | 16%   | 5%                    | 17%        |
| <b>T</b>     | 18%   | 16%                   | 17%        |
| <b>L</b>     | 17%   | 23%                   | 17%        |
| <b>IL</b>    | 16%   | 18%                   | 17%        |
| <b>S</b>     | 17%   | 32%                   | 16%        |

C: cervical; IC: intumescência cervical; T: torácica; L: lombar; IL: intumescência lombar; S: sacral

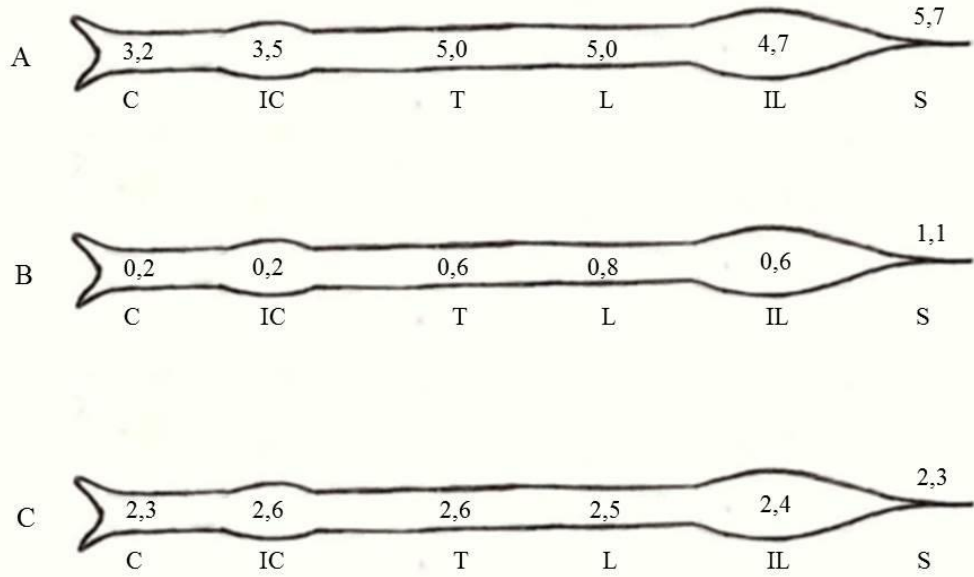


**Figura 1**

**Figura 2**



**Figura 3**

**Figura 4**

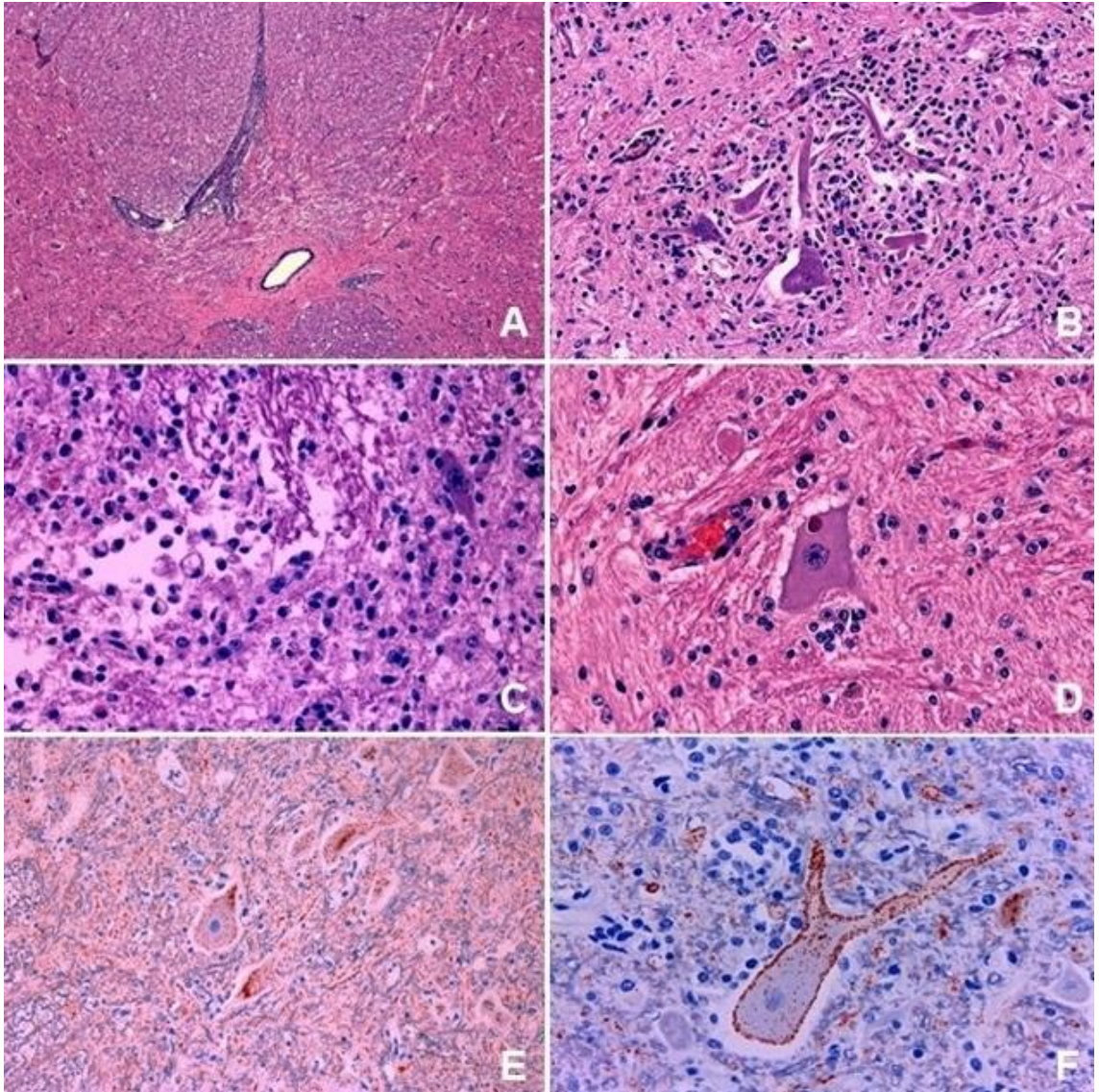


Figura 5

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Das necropsias realizadas no período deste estudo, a raiva correspondeu a 12% dos diagnósticos conclusivos em bovinos e em 6% dos equinos necropsiados pelo SPV-UFRGS.

Áreas multifocais de hemorragia localizadas especialmente em substância cinzenta da medula espinhal foram achados patológicos significativos em equinos. A coleta deste material acresce em 3,5 vezes a chance de um diagnóstico conclusivo de raiva na espécie equina, quando comparado à análise isolada do encefálo.

Com este trabalho conclui-se que a coleta deste tecido é de grande importância para o diagnóstico em ambas as espécies, já que os 33 casos analisados neste estudo demonstraram lesões microscópicas compatíveis com raiva na medula espinhal, caracterizadas pela presença de manguitos perivasculares, microgliose, neuroniofagia e presença de células gitter. Além disso, sugere-se a coleta e o envio deste material para o diagnóstico de raiva em todos os casos em que animais apresentarem alterações neurológicas.

O teste de IHQ demonstrou imunomarcação positiva em neurônios e seus prolongamentos em 100% dos casos, divergindo do observado nos demais testes aplicados neste estudo, o que ressalta a importância deste método com ferramaneta auxiliar no diagnóstico da raiva.