

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS - PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

MONOGRAFIA

Produção de soro hiperimune anti – rábico em caprino

Alexandre Mamede dos Santos

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS - PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

MONOGRAFIA

Produção de soro hiperimmune anti – rábico em caprino

Alexandre Mamede dos Santos

Graduando

Prof. Dr. Albério Antônio de Barros Gomes

Orientador

Patos

Maio de 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS - PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

ALEXANDRE MAMEDE DOS SANTOS.

Graduando

**Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para
obtenção do grau de Médico Veterinário.**

APROVADO EM...../...../.....

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Albério Antônio de Barros
Orientador

Dr. Sérgio Santos Azevedo
Examinador - I

Prof: Theonys Diógene Freitas
Examinador - II

Dedico aos meus pais, *Damião Lilioso dos Santos, e Lúcia de Fátima Mamede dos Santos exemplos de vida e dignidade; A minha companheira Sérgio Gomes da Silva, pelo apoio constante durante o curso e em todos os momentos de minha vida; Ao meu enteado Joanderson G. de Araújo e aos meus queridos irmãos pelo incentivo, esperando que fique germinado em seus corações o meu eterno amor.*

AGRADECIMENTOS

A “Deus”, em primeiro lugar, por todas as oportunidades concedidas na minha vida, somente ele é conhecedor das minhas dificuldades.

Sei que estou realizando não o meu sonho, mas o sonho de uma família inteira que orava e torcia para que esse momento chegasse.

Aos meus pais, exemplo de vida e dignidade, que com sua humildade fez de mim um indivíduo capaz de acreditar nos meus sonhos; estando sempre ao meu lado pela confiança e principalmente o amor.

Aos meus seis irmãos Lislândia, Francisco Neto, José Eudes, João Paulo, Lídia e Vinicius, pela confiança e admiração.

Aos meus avós João Mamede, Francisca Medeiros, Francisco Benvinda, Raimunda Liliosa pelo apoio e orações.

Aos meus tios e padrinhos que abriram as portas da sua casa mim acolhendo por um longo período durante o curso, José Benvindo dos Santos e Benigna Moraes dos Santos , bem como todos os outros tios e tias meu muito obrigado.

Ao professor Dr. Albério Antônio de Barros pelos seus ensinamentos.

A Maria Luana Crystiny Rodrigues Silva por ter contribuído para realização desse trabalho.

A minha fiel companheira Sérgila Gomes da Silva que junto comigo muitos obstáculos enfrentou sempre com palavras firmes mim encorajando para que nunca desistisse.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1 Histórico.....	10
2.2 Agente etiológico.....	11
2.3 Patogenia.....	12
2.4 Patogênese.....	13
2.5 Epidemiologia.....	14
2.6 Controle e erradicação.....	14
2.7 Diagnóstico.....	15
2.8 Prevenção e profilaxia.....	18
2.9 Resposta imunológica.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Materiais.....	22
3.1.1 Animais.....	22
3.1.1.1 Caprino.....	22
3.1.1.2 Camundongos.....	22
3.1.2 Vírus.....	22
3.1.3 Diluente.....	23
3.1.4 Antígeno.....	23
3.1.5 Soro anti-rábico padrão.....	23
3.2. MÉTODOS.....	23

3.2.1 Prova de imunofluorescência direta	23
3.2.2 Prova de inoculação intracerebral em camundongos	23
3.2.3 Titulação do vírus.....	24
3.2.4 Soroneutralização.....	24
3.2.5 Delineamento experimental.....	24
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	26
5. CONCLUSÃO.....	27
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

RESUMO

SANTOS, ALEXANDRE MAMEDE DOS. Produção de soro hiperimune anti-rábico em caprinos. UFCG 34p. Curso de Medicina Veterinária— Patos — Paraíba

A Raiva é endêmica na Paraíba e apesar disso não existe um Laboratório Oficial para o diagnóstico dessa enfermidade. Entre as técnicas de referências está a Imunofluorescência direta, contudo, uma das suas limitações é a aquisição do conjugado Anti-rábico. Com o objetivo de produzir um soro hiperimune anti - rábico em um animal de baixo custo e fácil manuseio, foi hiperimunizado um caprino adulto jovem utilizando uma vacina comercial e uma amostra de vírus CVS para desafio. O soro caprino hiperimune apresentou título superior a 6250 para 10 a 100 DL₅₀ de CVS/ 0,03 mL/ICC de 21 dias. A partir disso, conclui-se que o caprino é um bom modelo biológico para produção de soro hiperimune anti - rábico, viabilizando a produção de um conjugado anti-rábico.

Palavras Chaves: Raiva, produção de soro, conjugado anti-rábico, caprino.

ABSTRACT

SANTOS, ALEXANDRE MAMEDE DOS. Production of hiperimmune antirabic serum in goats. UFCG 34p. Veterinary Medicine Course – Patos City – Paraíba – Brazil.

Rabies is endemic in Paraíba and in spite of this, there is no Official Laboratory to diagnose this disease. Among the techniques of references is the direct immunofluorescence, therefore, one of its limitations is the acquisition of antirabic conjugated. This work aims to produce a hiperimmune antirabic serum in an animal of low cost and easy management, an young adult goat was hiperimmunized using a commercial vaccine and a sample of CVS virus to challenge. The hiperimmune goat serum presented a titre superior to 6250 from 10 to 100 LD₅₀ of CVS/0,03 mL/ ICC of 21 days. In respect of this, it can conclude that the goat is a good biological model to produce hiperimmune antirabic serum, which means that it can be possible the production of antirabic conjugated.

Key-words: Rabies, serum production, goat antirabic conjugated

1- INTRODUÇÃO

Provavelmente todas as espécies animais de sangue quente são passíveis de serem infectadas pelo vírus da raiva. No entanto, a maioria dessas espécies, quando infectadas, torna-se hospedeiros finais do agente, pois a infecção resulta em morte e não ocorre disseminação do mesmo para novos hospedeiros. Para garantir sua perpetuação na natureza, o vírus da raiva adaptou-se a determinadas espécies, denominadas “hospedeiros naturais”, as quais servem como reservatórios do vírus. Durante esse processo de adaptação, modificações genômicas e antigênicas são geradas, originando as chamadas “variantes” do vírus da raiva. Estas por vezes apresentam alterações que podem ser utilizadas como marcadores epidemiológicos, permitindo, por exemplo, a identificação da espécie fonte de infecção ou de variantes associadas a determinados nichos ecológicos.

Animais infectados com vírus respondem através da produção de anticorpos específicos. A detecção e avaliação desses anticorpos, os quais refletem o estado da doença, são utilizados para o planejamento de programas sanitários em rebanhos e em estudos epidemiológicos de surtos. A detecção dos anticorpos é também empregada no diagnóstico de doenças, e isso é muitas vezes um processo demorado que requer a avaliação dos níveis de anticorpos na fase aguda e convalescente, geralmente coletados num intervalo de 10 a 14 dias. Uma medida mais rápida é utilizar anticorpos específicos (soro hiperimune) para detectar os antígenos virais diretamente nas amostras clínicas. Esses anticorpos são obtidos através da hiperimunização de animais com vírus.

No estado da Paraíba não existe nenhum laboratório de diagnóstico oficial da raiva. Os casos tidos como prevalência, retratam apenas uma prevalência aparente baseado na maioria das vezes, apenas no diagnóstico clínico, uma vez que o estado também não oferece condições para o diagnóstico laboratorial fora de sua jurisdição.

O diagnóstico laboratorial da raiva apresenta algumas limitações entre elas a disponibilidade de um conjugado de boa qualidade que requer a hiperimunização e manutenção de animais. Na região semi-árida do Nordeste um dos animais que melhor se adapta e de menor custo de manutenção é o caprino.

Diante do exposto o presente trabalho teve como objetivo a produção de soro hiperimune anti-rábico em caprino.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

O vírus da Raiva é a causa de uma das doenças mais antigas e a mais letal de todas as doenças infecciosas. Foi reconhecida no Egito há 2300 anos antes de Cristo (WHITE e FENNER, 1994; COLLIER e OXFORD, 2000), Os gregos chamavam a Raiva de Lyssa ou Lytta, que significa “*loucura*”. Em latim, a palavra “*raiva*” deriva de “*rabhas*” do Sânscrito antigo que significa “*ser violento*” (STEELE e FERNANDEZ, 1991), ou “*rabere*” também do Latim, “*raiva*” ou “*loucura*” (PRESCOTT et al., 1996). Assim, em outros países, a mesma infecção recebeu outras denominações, a palavra alemã “*tollwut*”, originada do Indugermânico “*Dhvar*” (dano) e “*wut*” do alemão “*wuot*” (*rage*) na Alemanha. Em território francês, verificou-se que a palavra francesa “*rage*” é derivada do pronome “*robere*”, “*ser louco*” (STEELE e FERNANDEZ, 1991).

Cardanus, no século I, relatou a saliva de cães raivosos como a fonte de infecção e os especialistas romanos da época descreviam o material infeccioso como um veneno que, em Latim, era “*virus*” (STEELE e FERNANDEZ, 1991; MATTOS et al., 2001). Na medicina da Antiguidade, recomendavam-se os cáusticos, a cauterização, o uso de ventosas e a aspiração das feridas causadas por cães raivosos, de acordo com a extensão da lesão (COLLIER e OXFORD, 2000; MATTOS et al., 2001).

Os doutores sírios acreditavam, no começo do século IX, que a doença era incurável. Rhazes, médico árabe, mencionou a hidrofobia e descreveu um paciente que, quando olhava a água, tinha ataques com tremores e enrijecimento muscular (STEELE E FERNANDEZ, 1991). Outro médico árabe, Avicenna, no século XI, descreveu sinais cutâneos como eritema, designados de roséola rábica, também denominada de *pleiad rábica* e *bubo rábico*. Essas observações marcaram uma etapa importante para a compreensão da doença (FLEMING, 1872). Com o progresso da medicina as observações tornaram-se mais valiosas e detalhadas, embora a prevenção bem sucedida ou as tentativas de cura ainda fosse desconhecida (STEELE e FERNANDEZ, 1991).

Na primeira década dos anos 1800, Zinke (1804) demonstrou que a doença poderia ser transmitida pela inoculação da saliva, por intermédio de uma experiência simples: utilizou a saliva de um cão com Raiva, aplicada com um pincel, em incisões feitas em outro cão. Naquela época, ocorreram também avanços no conhecimento da infecção, que incluíam o comprometimento do sistema nervoso e, ainda a respeito da

fonte, da patogênese e do tratamento da Raiva (STEELE e FERNANDEZ, 1991). Em 1824, recomendava-se como tratamento, fazer incisões profundas nas feridas que deviam ser lavadas com água ou ácido clorídrico diluído. Depois que a ferida estivesse limpa e seca, era aplicado um ferro quente ou o ácido clorídrico concentrado (EKSTROM, 1830).

Somente ao final do século XIX ocorreram progressos significativos para o diagnóstico, tratamento humano profilático e controle da Raiva animal. Embora Pasteur não tenha conseguido identificar o vírus, já acreditava que um microrganismo infinitamente pequeno era a causa da enfermidade sob estudo, o que foi confirmado mais tarde pelos estudos de microscopia eletrônica (ATANASIU et al., 1963; DAVIES et al., 1963; MATSUMOTO, 1963).

No Brasil, a primeira epizootia de Raiva em herbívoros notificada ocorreu em Santa Catarina, entre 1906 a 1908. Foi denominada de Epizootia de Biguaçu, e estudada por Parreiras Horta, médico do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro (PARREIRAS e FIGUEIREDO, 1911). Carini do Instituto Pasteur de São Paulo, em 1911 identificou o vírus rábico determinando-o como agente causador da epizootia de Biguaçu e levantou a hipótese da raiva esta sendo transmitida por morcegos hematófagos. A suspeita de Carini foi confirmada alguns anos mais tarde, entre 1914 a 1918, por dois veterinários alemães contratados pelo governo brasileiro para estudar as mortes dos animais no sul do país (HAUPT e REHAAG, 1925). No período de 1980 a 2005, foram notificados 1.432 casos de Raiva humana no Brasil (BRASIL, 2006a). Entre 1997 e 2001, mais de 400 mil pessoas ao ano procuraram atendimento médico por terem sido expostas ou por se julgarem expostas ao vírus e 60% recebeu algum tipo de indicação de tratamento profilático (BRASIL, 2002). Entre os anos de 1980 e 2004, houve uma redução significativa no número de casos registrados por ano, caindo de 173 para 30, representando uma queda de 83%. A maioria dos casos está concentrada nas Regiões Norte e Nordeste.

No Estado da Paraíba, o último caso de Raiva humana foi em 1999 (ARAÚJO, 2002).

2.2. Agente etiológico

O vírus da raiva pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, que inclui pelo menos três gêneros de vírus que afetam animais, *Lyssavirus*, *Ephemerovirus* e *Vesiculovirus*. Atribuía-se a Raiva apenas uma espécie de vírus, até que os métodos

sorológicos, antigênicos e genéticos, demonstraram a existência de (pelo menos) sete genótipos diferentes (RUPPRECHT, et al., 2002).

O vírus possui a forma de *projétil* e seu genoma é constituído por ácido ribonucléico (RNA) de fita simples, não-segmentada e polaridade negativa (PRESCOTT et al., 1996)

A partícula viral possui diâmetro de 60 a 110 nm e comprimento variando de 100 a 300 nm (HUMMELER et al., 1967; VERNON et al., 1972). Morfologicamente pode ser dividida em duas unidades estruturais: a central – formada por um cilindro denso, o nucleocapsídeo de simetria helicoidal – e a periférica, um fino envelope de 8 nm de largura coberto com espículas, que envolve o nucleocapsídeo. (WHITE e FENNER, 1994).

O genoma codifica cinco proteínas, nucleoproteína (N), polimerase (L), fosfoproteína (P), glicoproteína (G) e proteína da matriz (M) No complexo ribonucleoproteína (RNP), a molécula de RNA genômico está fortemente associada à nucleoproteína N (SOKOL et al., 1971). Essa conformação protege o RNA da ação de ribonucleases e parece manter o RNA em uma configuração apropriada para a transcrição (SOKOL et al., 1969).

A glicoproteína é o antígeno de superfície capaz de induzir a formação e de reagir com os anticorpos neutralizantes (MATTOS *et al.*, 2001). Já a núcleo proteína é antígeno interno (BRASIL, 2002a).

O vírus é estável em uma faixa de pH entre 5 e 10 e é inativado por agentes físicos e químicos, como o calor, radiação ultravioleta, raios X, detergentes, agentes oxidantes (MATTOS et al., 2001). É sensível a solventes lipídicos, ao álcool etílico de 45% a 70%, às preparações iodadas e aos compostos quaternário de amônio (KAPLAN, 1996).

2.3 - Patogenia

A Raiva é transmitida principalmente pela mordedura de um animal infectado e mais raramente, pela arranhadura e lambadura de mucosas e/ou pele lesada (BRASIL, 2002). A pele íntegra é uma barreira importante ao vírus, mas as mucosas são permeáveis, mesmo quando intactas (COSTA et al., 2000). Existe a possibilidade de transmissão inter-humana iatrogenicamente por meio de transplante de órgãos cujos doadores morreram de Raiva não diagnosticada (WHITE e FENNER, 1994; COLLIER e OXFORD, 2000).

O vírus penetra no organismo, replica-se no ponto de inoculação, atinge o sistema nervoso periférico e, posteriormente, o SNC e causa um quadro clínico característico de encefalomielite aguda. Com a progressão do quadro clínico, ocorre a disseminação para vários órgãos. O vírus da raiva replica, também, nas glândulas salivares e é eliminado na saliva de pessoas ou animais infectados (BRASIL, 2002; XAVIER et al., 2005). O período de incubação é altamente variável e depende do local, tamanho e profundidade da ferida, e ainda da concentração de partículas virais inoculadas na mordida (Madigan et al., 2000).

2.4 – Patogênese

Depois da infecção inicial, o vírus entra em uma fase em que não é detectado. Esta fase pode durar para diversos dias ou meses. O período de incubação varia 3 a 12 semanas, podendo chegar a anos (BAER e LENTZ, 1991). O vírus pode alcançar diretamente as terminações nervosas sensoriais e/ou motoras, ou permanecer algumas horas nas células musculares estriadas, onde ocorre uma amplificação viral, que propiciará a infecção dos nervos periféricos (TSIANG, 1988). O receptor nicotínico da acetilcolina é local de ligação (WHITE e FENNER, 1994; PRESCOTT et al., 1996; COLLIER e OXFORD, 2000; TYLER e NATHANSON, 2001). O genoma viral é transportado no interior do axoplasma dos neurônios, centripetamente, provocando os primeiros sinais específicos da doença, como a dor ou a parestesia no local da ferida (PRESCOTT et al., 1996), até alcançar o Sistema Nervoso Central (SNC) (TSIANG et al. 1991).

As manifestações clínicas, como ataxia ou depressão, são em consequência do efeito direto do vírus na função das células neurais (TOLLIS et al., 1991). O vírus alcança o sistema límbico, responsável pelo comportamento e, conseqüentemente, pela agressividade manifestada pelos hospedeiros durante a doença (GERMANO, 1994). Uma encefalite progressiva se desenvolve rapidamente enquanto o vírus dissemina pelo SNC (PRESCOTT et al., 1996). Replica-se no neocórtex, levando a Raiva parálitica, que evolui a depressão, coma e morte por depressão respiratória (WHITE e FENNER, 1994; MADIGAN et al., 2000).

2.5 – Epidemiologia

O vírus da Raiva ocorre em todo mundo, exceto na Austrália, na Antártida e em algumas ilhas como o Japão e a Nova Zelândia (MATTOS et al., 2001). Os reservatórios da infecção variam de acordo com a área geográfica, sendo os cães e os gatos as fontes de maior importância na infecção humana. Os outros reservatórios importantes são os lobos na Europa Oriental, a raposa vermelha na Europa Ocidental, os mangustos e morcegos vampiros no Caribe, gambás, guaxinins e morcegos nos EUA e Canadá, e os morcegos vampiros na América Latina (COLLIER e OXFORD, 2000).

No Brasil, os transmissores mais importantes são o cão e o gato, em áreas urbanas, e os morcegos que mantêm o ciclo silvestre da doença. Os casos confirmados de Raiva orientam as ações de vigilância epidemiológica da doença, porém a ocorrência de casos em área urbana indica deficiência das ações dirigidas à população animal, como a vacinação de cães e o controle de animais vadios além da atenção aos indivíduos expostos ao risco, incluindo o tratamento profilático e o diagnóstico de animais agressores (BRASIL, 2002b).

Estimativas revelam que, a cada 15 minutos, é registrada uma morte e mais de 300 outras pessoas são expostas ao vírus da raiva no mundo (RUPPRECHT et al., 2002). A cada ano ocorrem 75 mil casos de Raiva humana no mundo (WHITE e FENNER, 1994), sendo aproximadamente 35 mil nos países em desenvolvimento onde a Raiva ainda é endêmica em animais domésticos como o cão. (MADIGAN et al., 2000).

No Brasil, até o ano de 2003, o ciclo de transmissão predominante responsável pelos casos de Raiva humana era o urbano, e o cão contribuiu com a maioria dos casos. No ano de 2004 houve uma inversão dessa situação, quando o morcego tornou-se o principal responsável pelos casos de Raiva humana, devido à ocorrência de dois surtos nos municípios de Portel e Viseu no Pará (BRASIL, 2002c), totalizando 15 casos confirmados (BRASIL, 2002c; BRASIL, 2004). Essa situação se repetiu no ano de 2005, devido aos surtos no Pará e Maranhão, onde foram notificados 32 casos de Raiva humana, sendo 30 por morcegos, um por cão e um por primata não-humano (BRASIL, 2002c).

2.6 - Controle e Erradicação

Os princípios para o controle da Raiva incluem o controle de populações (cães, gatos e morcegos) como a primeira etapa. Os Estados Unidos gastam anualmente dez milhões de dólares no controle animal. É difícil estimar a população mundial de cães, mas

usando a relação de um a dez para 6 bilhões de pessoas, a população canina estimada pode se aproximar a 600 milhões. A informação, a pesquisa e a vacinação fazem parte do tripé para os programas de controle da Raiva no mundo (OMS, 1983).

Eliminar o vírus da raiva, no entanto, apresenta um alto grau de dificuldade, uma vez que a Raiva é endêmica em muitos animais selvagens que transmitem o vírus direta ou indiretamente ao homem (DIMMOCK et al., 2001). Nos países desenvolvidos, onde a Raiva foi controlada ou eliminada dos animais domésticos, os esforços são concentrados para controle da Raiva nos animais silvestres. Nesses países está sendo estudada a vacinação oral, utilizando vacinas recombinantes e de DNA (MARCOVISTZ et al., 2005). A OMS vem experimentando a imunização de animais selvagens distribuindo iscas de carne com vacina de vírus ativado. Por exemplo, na Bélgica, foi usada uma vacina projetada geneticamente para expressar a proteína do envelope do vírus que tem apresentado bons resultados (DIMMOCK et al., 2001).

Para o estabelecimento de um sistema eficiente de controle da Raiva, além das ações diretas nos animais, o programa deve incluir o tratamento das pessoas expostas ao risco da infecção, a vigilância epidemiológica contemplando a coleta e o envio de material para exames de laboratório, o controle de áreas de foco de Raiva e a educação em saúde (REICHMANN et al., 1999; BRASIL, 2002a).

2.7 - Diagnóstico

O diagnóstico da Raiva é realizado por detecção do antígeno viral em amostras biológicas provenientes de animais e seres humanos (KONEMAN et al., 2001). Todo material coletado para o diagnóstico da Raiva deve ser considerado potencialmente infeccioso e precauções durante a manipulação e o transporte devem ser tomadas. É necessário enviar a cabeça do animal suspeito, o encéfalo inteiro ou fragmentos do tecido cerebral de ambos os hemisférios (córtex, cerebelo e hipocampo) (COSTA et al., 2000). Os fragmentos de eleição do SNC a serem coletados para diagnóstico laboratorial da Raiva, de acordo com a espécie são: o hipocampo e medula nos cães e gatos; o cerebelo e medula espinhal no bovino; medula nos eqüídeos; cérebro e cerebelo nos ovinos, caprinos e suínos; para animais silvestres, cérebro, cerebelo e medula, ou quando possível enviar animal inteiro para a identificação da espécie (BRASIL, 2002^a).

Durante a coleta da amostra, o técnico deve usar instrumentos preferencialmente esterilizados e paramentação adequada, como luvas de borracha resistente, protetor facial e

vestimenta apropriada (COSTA et al., 2000; SMITH, 2003). Todo indivíduo que executa, ou auxilia, necrópsias de animais com suspeita de raiva deve submeter-se ao esquema vacinal de pré-exposição e ter seu soro titulado para anticorpos anti-rábitos duas vezes ao ano. A amostra selecionada deve ser devidamente embalada e identificada, colocada em caixa de isopor, com gelo suficiente. A forma de conservação dependerá do prazo estimado entre a coleta da amostra e a chegada ao laboratório. Até 24 horas, o material deve ser refrigerado e para período maior, obrigatoriamente congelado. Na falta de condições apropriadas de refrigeração, o material deverá ser conservado em solução salina com glicerina a 50%. Nunca devem ser utilizados formol ou outros conservantes que inativem o vírus (COSTA et al., 2000; BRASIL, 2002a).

Para o diagnóstico da Raiva em humanos, as amostras utilizadas incluem a saliva, o líquido cérebrospinal (LCE), biópsia de pele da região occipital e 15 impressão de córnea. Uma variedade de métodos podem ser utilizados dependendo do estágio da infecção. Dentre esses, citem-se: a imunofluorescência direta, a cultura e isolamento pela inoculação intracerebral em camundongos ou em células de neuroblastoma e a amplificação do ácido nucléico (PCR transcriptase reversa RT/PCR). Após o oitavo dia da doença, os anticorpos podem estar presentes e são utilizados para o diagnóstico caso o paciente não tenha histórico de imunização. A presença de anticorpos para Raiva no LCE é sempre indicativa de diagnóstico positivo para a Raiva. Ao serem recebidas, as amostras devem ser processadas imediatamente, e quando não seja possível, mantidas a -20° C. (CRESPIN et al. 1998; STORCH, 2001; MATTOS et al., 2001; BRASIL, 2002^a; SMITH, 2003; OMS, 2004).

O diagnóstico *post-mortem* deve ser executado em amostras do SNC, especialmente cérebro e cerebelo. O teste de IFD e o método imunohistoquímico da avidina-biotina são sensíveis e específicos para detectar o antígeno viral (MATTOS et al., 2001).

As lesões histológicas causadas pelo vírus da raiva no homem e nos animais são geralmente limitadas ao SNC, podendo ser discretas ou, mesmo, estar ausentes. Um quadro característico de encefalomielite pode ser observado. O exame microscópico pela coloração de hematoxilina e eosina, revela a presença de infiltrado mononuclear, acúmulos perivasculares principalmente de linfócitos, constituídos por células gliais, variados graus de degeneração, apoptose e necrose dos neurônios. Classicamente são citados os corpúsculos de Negri (inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas) observados nos neurônios (STORTS e MONTGOMERY, 2001). Há uma destruição celular mínima em

contraste com a extensa disfunção neurológica observada na doença (WHITE e FENNER, 1994). Uma miocardite está frequentemente presente, com inclusões citoplasmáticas características (corpúsculos de Negri) em alguns pacientes (COLLIER e OXFORD, 2000).

A soroneutralização do vírus da raiva é o método utilizado para a detecção de anticorpos. Neste método, as diluições de soro são incubadas com uma quantidade fixa de vírus e o vírus infectante residual é determinado pela inoculação em animais ou cultura de células (SMITH et al., 1996). Dois tipos de testes de soroneutralização são, rotineiramente, utilizados para quantificar os anticorpos neutralizantes contra Raiva: Teste de Neutralização em Camundongo (TNC) e a Rápida Inibição de Focos Fluorescentes (RIFF) (SMITH, 1991; OMS, 1992; CHIQUET et al., 1998). O TNC tem sido considerado como a prova de referência também para quantificar anticorpos neutralizantes para Raiva. Os animais inoculados são observados por 15 dias para acompanhar a evolução clínica da doença (RIZZO, 1983).

As alternativas menos dispendiosas e mais rápidas que o TNC foram desenvolvidas com a adaptação do vírus da raiva em cultura de células. O primeiro dos métodos, desenvolvido em cultura de células, foi o teste de redução em placa. A desvantagem deste procedimento é o tempo requerido de 5 a 7 dias (WIKTOR e CLARK, 1973).

Os anticorpos também podem ser titulados por uma modificação do RIFF (SMITH et al., 1973). A RIFF consiste em misturar o soro sob teste com a suspensão viral, adicionando esta mistura à monocamada de células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*). Esse procedimento revela a presença ou ausência de infecção viral após 24 horas, avaliada pela IFD (ZALAN et al., 1979; SMITH et al., 1996). Embora a TNC seja um teste de referência, a RIFF vem sendo utilizada como a técnica de escolha e é tão sensível quanto a TNC para a titulação de anticorpos específicos – e os resultados têm boa correlação (SMITH et al. 1973; KHAWPLOD et al., 2005).

A Contraímunoeletroforese (CIE) é outra técnica *in vitro* para titulação de anticorpos neutralizantes para Raiva. Detecta basicamente anticorpos da classe IgG, anti-glicoproteína do vírus da raiva, a principal imunoglobulina envolvida na proteção contra a doença. Por essa razão é capaz de determinar o potencial neutralizante dos soros analisados (DIAZ e MYERS, 1980; DIAZ e MYERS, 1981).

A CIE apresenta boa especificidade, porém é menos sensível que o TNC e não detecta baixas concentrações de anticorpos. Devido à menor sensibilidade da CIE, o título

mínimo de anticorpos (1:25 ou 0,5 UI/mL pelo TNC) encontra-se no limite da capacidade de detecção da técnica (DIAZ, 1985).

O teste de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), por sua vez, tem sua melhor aplicação no diagnóstico *ante-mortem* e deve detectar qualquer anticorpo induzido pelas proteínas virais. Quando o ELISA é utilizado para estimar a resposta imunológica a vacinação, o kit deve conter apenas a proteína G (SMITH, 2003). Esse teste dispensa a microscopia de fluorescência para determinar títulos de anticorpos nos soros diluídos e distribuídos em micro placas de 96 poços. O título do vírus é detectado pela leitura em espectrofotometria (492 nm) e calculado comparando com o soro controle negativo (SMITH, 1991).

Outros métodos têm sido desenvolvidos para a titulação de anticorpos contra o vírus da raiva, como o micro método para anticorpos neutralizantes e a citometria de fluxo (ANDRULONIS et al. 1976; VENGATESAN et al., 2006).

2.8 - Prevenção e Profilaxia

A profilaxia da Raiva humana pode ser feita por pré ou pós-exposição ao vírus. A profilaxia na pré-exposição compreende a vacinação, e é indicada para pessoas que correm o risco de exposição devido à atividade profissional, como os médicos veterinários. A profilaxia de pós-exposição tem indicação quando ocorrem exposições acidentais e deve incluir além da limpeza da lesão, a administração da vacina contra a raiva isoladamente ou associada ao soro ou a imunoglobulina humana anti-rábica (COSTA et al., 2000).

Após a limpeza, devem ser utilizados anti-sépticos que inativem o vírus, como o polivinilpirrolidona-iodo (PVPI®, Rioquímica), gluconato de clorexidina (Chlorohex®, Johnson) ou álcool iodado. O profissional que estiver assistindo o caso deve fazer a anamnese completa visando a indicação correta do atendimento profilático (BRASIL, 2002a).

Além da imunização, as pessoas em risco devem receber a vacina associada à imunoglobulina, o que reduz substancialmente a mortalidade (WHITE e FENNER, 1994). O soro heterólogo pode ser preparado a partir de soro de cavalos hiperimunizados (SAR) enquanto a imunoglobulina anti-rábica humana (*Human Rabies Immunoglobulin* – HRIG) é produzida a partir do plasma de doadores previamente imunizados. Quando o SAR ou a HRIG não são administrados no início do esquema de vacinação, deverão ser aplicados antes da 3ª dose das vacinas de cultura celular ou embrião de pato. Após esse período, o

emprego não é mais necessário, porque a própria vacina determina títulos de anticorpos protetores. Pacientes que previamente receberam tratamento completo para prevenção da Raiva não devem receber SAR ou HRIG (Costa et al., 2000).

A pesquisa laboratorial em Raiva teve, especialmente no final da década de 1980, um avanço considerável. Destacam-se, principalmente, a evolução da qualidade das vacinas anti-rábicas, tanto as destinadas a seres humanos, quanto às espécies animais. O aprimoramento das vacinas de uso humano possibilitou uma drástica redução dos esquemas de tratamento pós-exposição (GERMANO, 1994). As perspectivas para o futuro, em matéria de imunógenos anti-rábicos, tanto para seres humanos, quanto para animais domésticos e silvestres, estão relacionadas com a produção de vacinas recombinantes, vacinas preparadas a partir da ribonucleoproteína do vírus da raiva e vacinas preparadas com peptídeos sintéticos carreando epítomos para linfócitos B. Anticorpos monoclonais humanos específicos contra a glicoproteína e a nucleoproteína do vírus serão utilizados no tratamento anti-rábico pós-exposição (GERMANO et al., 1988; WILDE et al., 1991; GERMANO, 1994; HALON et al. 2001; FOLLMANN et al., 2004; IRIE e KAWAI, 2005; MARISSSEN et al., 2005).

2.9 - Resposta imunológica

A intervenção imunológica é eficaz durante o longo período de incubação devido à demora entre a replicação inicial e a entrada do vírus no ambiente protegido do sistema nervoso. Mesmo a imunização de pós-exposição sendo muito eficaz, deve ser feita o mais próximo possível do momento da agressão pelo animal suspeito, uma vez que, se os sinais clínicos surgirem, será demasiado tarde. Embora as proteínas do vírus da raiva sejam altamente imunogênicas, nem as respostas mediadas por célula e humoral podem ser detectadas durante a migração do vírus do local da mordida ao SNC (WHITE e FENNER, 1994; DIMMOCK et al., 2001).

Quando a resposta imunológica antiviral acontece após a vacinação ou tardiamente na infecção, uma combinação de resposta imunológica específica (humoral ou mediada por células) ou não-específica é observada. Os antígenos da partícula viral são capturados pelas células apresentadoras de antígeno (CAA) como macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans, que após os fagocitarem, processam e apresentam os antígenos para as células imunológicas. Os antígenos processados são expressos na superfície de CAA associados a moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade e

apresentados aos linfócitos. Já os macrófagos são células importantes para a produção de anticorpos pelos linfócitos B para a ativação dos linfócitos T auxiliares produtores de diferentes citocinas envolvidas na ativação de diferentes células implicadas na eliminação direta do vírus ou de células infectadas. Embora tenham função crucial na resposta imunológica inespecífica, os macrófagos podem produzir um efeito negativo auxiliando a difusão do vírus no organismo, após a opsonização de complexos imunológicos anticorpo-vírus levando à "mortalidade precoce" (ZANETTI, 2003).

A infecção da célula pelo vírus da raiva induz a liberação de interferons (IFN) que são de grande importância no início da infecção, particularmente antes de sua migração para o SNC. Anteriormente, acreditava-se que a atividade protetora de uma vacina anti-rábica estivesse relacionada com sua habilidade de induzir a produção de IFN, entretanto, é sabido que algumas vacinas de boa eficácia não são indutoras de IFN. Na infecção natural a síntese de imunoglobulinas pelos linfócitos B, geralmente, não ocorre até que os sinais clínicos apareçam. A produção de anticorpos acontece depois que a infecção está disseminada pelo SNC, devido à quantidade maciça de antígeno viral processado pelas CAA. O título de anticorpos neutralizantes permanece baixo, elevando-se, atinge seu pico próximo da morte, na fase terminal da doença. A classe de imunoglobulina que predomina na infecção tardia é a IgG, e pouca ou nenhuma IgM é detectada (ZANETTI, 2003).

Assim, o papel principal dos anticorpos é bloquear o vírus extracelular antes que ocorra a interação com receptores das células musculares, limitando a propagação no local de infecção e a progressão para o SNC (ZANETTI, 2003). Segundo o modelo estudado por Flamand e colaboradores (1993), a dose neutralizante é de 130 a 320 moléculas de IgG, sendo 3 moléculas por projeção espinhosa da proteína G, ou 40 a 50 moléculas de IgM por virion.

A neutralização do vírus da raiva, por sua vez, é dependente de três fatores: do anticorpo, do antígeno e da célula alvo (FLAMAND et al., 1993). Quase todas as vacinas são apoiadas nos aspectos funcionais da proteína G, conferindo imunidade contra uma infecção letal. Os anticorpos exercem seu efeito protetor pela neutralização extracelular do vírus, pela lise de células infectadas mediada por complemento e pela citotoxicidade dependente de anticorpos. A ribonucleoproteína também induz uma resposta específica de anticorpos que podem contribuir contra a infecção (MATTOS et al., 2001).

É importante destacar que, dentre todas as respostas do sistema imunológico, a produção de anticorpos é a mais acessível para detecção laboratorial. Sua determinação

pode ser considerada como indicadora de que os outros mecanismos de defesa foram ativados, já que tem sido demonstrado, em experimentos com animais, que há boa correlação entre o nível de anticorpos circulantes e a proteção contra o desenvolvimento da doença. Duas a quatro semanas após o início do esquema profilático anti-rábico, espera-se a produção de anticorpos suficientes para reagir totalmente a uma concentração padrão de vírus da raiva no Teste de Neutralização em Camundongos (TNC), na diluição 1:25. Esta diluição, equivale a aproximadamente 0,5 UI/mL, é a recomendada pela OMS, como índice mínimo de proteção (OMS, 1992). A avaliação sorológica deve ser realizada a partir do 10º dia da administração da última dose da vacina e somente títulos iguais ou acima de 0,5 UI/mL de anticorpos neutralizantes são considerados como satisfatórios.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1-MATERIAIS

3.1.1 Animais

3.1.1.1 - Caprino

Foi utilizado um caprino da raça moxotó, com faixa etária de um ano e meio. O animal foi vacinado, desafiado e 14 dias após o desafio foi realizada colheita e posteriormente separação do soro. O animal foi mantido em uma baia pertencente à UAMV/CSTR/UFCG.

3.1.1.2 – Camundongos

Foram utilizados camundongos suíços albinos, adultos jovens, com peso variando de 12 a 16 gramas (21 dias), linhagem CH3 - Rockfeller, para repasse viral, soroneutralização e titulação viral.

Todos os animais eram provenientes do biotério da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária do CSTR - UFCG.

Os animais foram mantidos no infectório do Laboratório de Virologia, temperatura média de 22°C e com água e ração *ad libitum*.

Incluindo a premissa de uma expectativa razoável de benefício imediato ou eventual para a sociedade ou para os animais, foram seguidos alguns critérios, tais como o tratamento humanitário aos animais, evitando o estresse excessivo, minimizando a dor e o desconforto e, principalmente, evitando o uso desnecessário de animais. Assim, todas as etapas de experimentação animal seguiram os princípios éticos do uso de animais de experimentação (ANDERSEN et al. 2004; CCAC, 1984).

3.1.2 -Vírus - Amostra CVS 31/2 (Challenge Virus Standard)

O vírus utilizado para o desafio experimental foi a amostra CVS mantida pelo Laboratório de Virologia do CSTR/UFCG, A amostra foi reativada mediante uma passagem em camundongos por via intracerebral, preparado-se uma suspensão com

diluído a 10% p/v com os cérebros dos camundongos infectados, antes de ser inoculada no animal, no primeiro desafio e 20 % p/v no segundo e utilizada como antígeno na prova de soroneutralização e na prova de IFD para a absorção do conjugado anti-rábico.

3.1.3 – Diluente

Foi utilizado um diluente constituído de água destilada esterilizada, contendo 2% (v/v) de soro de coelho, esterilizado por filtração com filtro clarificante Millipore®, com pH 7,2, contendo penicilina (500 UI/mL) e estreptomicina (1560 UI/mL), conforme Koprowski (1996), para preparação das suspensões de cérebros para repasse, para a prova biológica em camundongos e diluição do vírus para titulação em camundongos

3.1.4 - Antígeno vacinal

O antígeno utilizado foi a vacina comercial inativada contra vírus rábico, preparada em cultivo celular com vírus rábico fixo, inativada pela betapropriolactona e adjuvada pelo hidróxido de alumínio e saponina. Partida 012/07, Laboratório Vallee, Fabricação junho de 2007 e vencimento jun/09.

3.1.5 - Soro anti-rábico padrão

Utilizou-se na prova de soroneutralização em camundongos, o soro anti-rábico positivo padrão, aferido em UI/ML, contendo 200 UI/ML, lote 0810161/B, fabricado em 09/2008, com validade até 09/2011 procedente do Instituto Butantan. Gentilmente doado pela Vigilância Sanitária Municipal de Patos – PB.

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 - Prova de imunofluorescência direta (IFD)

Foi realizada a IFD de acordo com o método descrito por Goldwasser e Kissling (1958), com ligeira modificação, descrita por Dean et al., (1996).

3.2.2 - Prova de inoculação intracerebral em camundongos (ICC)

A prova de ICC foi realizada conforme a metodologia descrita por Koprowski (1996).

3.2.3 - Titulação do vírus

A amostra do vírus CVS, após reativação por via IC em camundongos, foi titulada, em diluições seriadas de razão 10, com o diluente, partindo-se de uma suspensão inicial de cérebro de camundongos a 10% p/v e cada diluição do vírus foi inoculada por via intracerebral (IC) em 10 camundongos, com um volume de 0,03 mL. O título de vírus foi calculado de acordo com o método descrito por Reed e Muench (1938) e expressos em log da $DL_{50}/0,03\text{mL}$ por via intercerebelar em camundongos de 21 dias).

3.2.4- Soroneutralização

A prova de soroneutralização em camundongos foi realizada com o método de “dose fixa do vírus-diluição variada do soro”, de acordo com Luekrajang et al., (1996).

As amostras de soros foram previamente submetidas à temperatura de 56°C por 30 minutos para inativação do complemento. O soro caprino e o soro padrão foram diluídos de 1/2,5 até 1/1560, em volumes de 0,5 mL, acrescentando 0,5 mL de suspensão viral, as diluições finais dos soros foram 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125. Cada diluição foi ajustada para conter DL_{50} entre 10 e 100 $DL_{50}/0.03$ ml ICC em camundongos de 21 dias.

A prova foi acompanhada da titulação paralela do vírus CVS, incluindo-se o grupo de animais inoculados com o soro padrão positivo aferido em UI/mL. Os animais inoculados foram observados durante 21 dias em busca de sinais da raiva. Os cálculos dos títulos soroneutralizante 50% (SN_{50}) foram obtidos conforme o método descrito por Reed e Muench (1938) e expressos como recíproca da diluição.

3.2.5 -Delineamento experimental

Inicialmente o caprino foi vermifugado e submetido a um período de adaptação de trinta dias, recebendo ração três vezes ao dia e água a *ad libitum*.

Foi injetado 2ml da vacina por via subcutânea no caprino, uma vez por semana durante 4 semanas. Na sexta semana o animal foi inoculado com 1 ml de suspensão de cérebro de camundongo inoculados com amostra CVS, na concentração de 10% p/v. Na oitava semana o animal foi inoculado com 1 ml de suspensão de cérebro a 20% p/v. Após

14 dias da última inoculação de vírus o animal foi puncionado na veia jugular O soro separado e submetido a prova de soroneutralização em camundongo para avaliação do títulos.

4 - REULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra de soro de caprino e do soro padrão submetidos à soroneutralização em camundongos apresentaram títulos > 6250.

O título do CVS foi $10^{5.5}$ em $DL_{50}/0,03$ mL/ICC de 21 dias.

Diante da falta de referências para produção do soro caprino, utilizamos As diuições descritas no material e métodos, perante o valor encontrado sugerimos que diluições mais elevadas devem ser preparadas.

No ser humano, títulos 1/25 que corresponde a 0.5 UI/mL são interpretados como evidência de uma resposta à vacinação, conforme preconizado pelos especialistas da OMS e são aceitos como indicativo de imunidade. Nos animais, ainda não há uma definição de um título indicativo da imunidade, expressos em UI/mL. Gomes (1994) encontrou títulos de anticorpos anti-rábico em asininos e equinos, variando de 141 a 320, esses valores induziram proteção aos animais que haviam sido imunizados com vacina comercial de vírus inativado, e desafiados com amostra de vírus rábico isolado de raposa, e observados por 12 meses.

Redwan et al (2009) relata que três imunizações em ovinos produziram aproximadamente 7000 UI de anticorpo rábico purificado.

Richtzenhain et al (1991) produziu conjugado anti-rábico bom a partir de soro hiperimune de equino, no qual o soro tinha concentração 350 UI/mL com diluição de 1:90, enquanto Caporale et al (2009) produziu um conjugado anti-ribonucleoproteína utilizando soro de coelho com um título de 1:2560 com diluição de 1:400 até 1:500.

Embora não seja possível comparar as diferentes titulações em função das diferença entre as espécies utilizadas e dos métodos empregados para titulação, fica evidente que o alto título alcançado em caprino reflete o potencial dessa espécie para a produção de soro hiperimune anti-rábico.

5 – CONCLUSÃO.

Diante do exposto, conclui – se que o caprino prestou-se para produção de soro hiperimmune anti-rábico atingindo título elevado que viabiliza a produção de um conjugado anti-rábico.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRULONIS, J.A.; TRIMARCHI, C.V., SHIPHERD. S.V.; DEBBIE, J.G.; **A micromethod for measuring rabies-neutralizing antibody.** J Wildlife Dis 12, p. 552-554, 1976.

ARAÚJO, F. A. A. **Raiva humana no Brasil: 1992-2001.** 2002. 90 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas gerais, 2002.

ATANASIU, P.; LEPINE P, SISINAN, J.; DAVGNET, J.C., WITTEN M. **Etude morphologique du virus rabique des rues en culture de tissue.** CR Acad Sci, 1963. p. 256: 3219.

BAER, G.M.; LENTZ T.L.; **Rabies Pathogenesis to the Central Nervous System.** In: Baer GM, ed. **The natural history of rabies.** 2 ed. Boston: CRC Press; p. 105-120. 1991

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. **Programa Nacional de Profilaxia da Raiva. Norma Técnica de Tratamento Profilático Anti-Rábico Humano,** 1ª ed. Brasília: 2002; Fundação Nacional de Saúde.

CAPOPRALE, G. M. M. et al. **First Production of Fluorescent Anti – Ribonucleoproteins Conjugate for Diagnostico f Rabies in Brasil.** Journnal of Clinical Laboratory Analysis n. 23. 2009 p. 7 – 13.

CARINI, A. **Sur une grande epizootia de rage.** Annales de l’Institut Pasteur 11: p 843-846. 1911

CHIQUET F, AUBERT M, SAGNE I. **Development of a fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody.** J Immunol Methods p. 79–87. 1998.

COLLIER L, OXFORD J. **Human virology. A text for students of medicine, dentistry and microbiology.** 2 ed. New York: Oxford University Press, 2000.

COSTA W.A. et al. **Profilaxia da Raiva humana**. 2ª ed. São Paulo, Instituto Pasteur,(Manuais, 4). 2000

CRESPIN, P.et al. **Intravital Diagnosis of Human Rabies by PCR Using Saliva and Cerebrospinal Fluid**. J Clin Microbiol; n 36 (4) , 1998, p 1117–1121.

DAVIES, MC. et al The. **electron microscopy of rabies virus in cultures of chicken embryo tissues**. Virology; 21; 1963, p 642-51.

DIAZ, AM.; MYERS, D.M. **Determinação of serum neutralization antibodies to rabies vírus by a modified counterimmunoelectrophoresis test**. J Clin Microbiol n 12(2), 1980, p 175-179.

DIAZ, A.M.; MYERS, D.M. **Comparison between a modified counterimmunoelectrophoresis test and the indirect fluorescent antibody test for detection of antibodies to rabies virus in human sera**. J Clin Microbiol.; n.14: 1981; p 446-448.

DIAZ, A.M. **Técnica de Contrainmunolectroforesis para el Diagnostico de la Rabia**.Serie de Monografias Científicas y Técnicas.; 1985. OPS; p. 13-38.

DIAZ, A.M. et al. **La Técnica de Contrainmunolectroforesis para la Determinación de Anticuerpos Antirrábicos**. Bol Ofic Sanit Panamer n 101: 1986; p.255-261.

DIAZ AM,et al . **Evaluación de la Calidad de los Reactivos que se utilizan en la Técnica de Contrainmunolectroforesis para la Determinación de Anticuerpos Antirrábicos**. Rev Inst Med Trop São Paulo n33, 1991, p.44-49.

DIMMOCK, N.J.; EASTON A.J.; LEPPARD, K.N. **Introduction to modern virology**. 5 ed. Oxford:Blackwell Publishing; 2001.

DIETZSCHOLD B, et al . **Structural and immunological characterization of a linear virus neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine**. J Virol, n 64, 1990, p. 3804-3809.

EKSTROM, F.A.; **Rabies epidemic at Stockholm in 1824**. London Med Gas 1830. p. 6: 689.

FOLLMANN, E.H.; RITTER, D.G.; HARTBAUER, D,W. **Oral Vaccination of Captive Arctic Foxes with Lyophilized SAG2 Rabies Vaccine.** J Wildlife Dis n40(2); 2004; p 328–334.

FLAMAND, A.; RAUX, H.; GAUDIN, Y.; RUIGROK, W.H.; **Mechanisms of Rabies Virus Neutralization.** Virology n.194, 1993; p. 302-313.

FLEMING, G, Rabies and Hydrophobia: **Their History, Nature, Causes, Symptoms, and Prevention.** London: Chapman and Hall; 1872.

GERMANO, P.M.L.; **Avanços na pesquisa da raiva.** Rev Saúde Publica 1994; n.28(1), p.86-91.

GERMANO, P.M.L.; SILVA, E.V, SUREAU, P. **Determinação de perfil antigênico de três cepas de vírus rábico isoladas no Brasil, através da técnica dos anticorpos monoclonais antinucleocapside.** Rev Fac Med Vet Zootec Univ São Paulo,n 25,1988; p.199-205.

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

GOUVÊA. M.V.; SILVA M.V. **An improved method using suckling mice to detect rabies neutralizing serum antibodies level.** XI Encontro Nacional de Virologia e 3 Encontro de Virologia do Mercosul; 2000 nov. 25-29; São Lourenço, Brasil.

HAUPT. H, REHA,A.G. H. **A Raiva epizoótica nos rebanhos de Santa Catarina.** Bol Soc Bras Med Vet 2: 1925; p. 36.

HUMMELER, K.; KOPROWSKI H, WIKTOR, T.J. **Structure and development of rabies virus in tissue culture.** J Virol,1: 1967; p.152.

HANLON CA.; et al. **Experimental utility of rabies virus-neutralizing human monoclonal antibodies in post-exposure prophylaxis.** Vaccine n.19,2001; p. 3834–3842.

IRIE T. KAWAI. A. **Further studies on the mechanism of rabies virus neutralization by a viral glycoprotein-specific monoclonal antibody, #1-46-12.** Microbiol Immunol n.49(8): 2005; p. 721-731.

KAPLAN, C.; TURNER, G. S.; WARRELL, D. A. **Rabies: The facts**. 2. ed. Oxford, Oxford University Press, 1986. 126 p.

KAPLAN, M. M. **Safety precautions in handling rabies virus**. In: **Meslin, F-X, Kaplan, Meslin MM, Koprowsky, H. Laboratory techniques in rabies**. 4 ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 3-8.

KOPROWSKI, H. **The virus – Overview**. In: **Baer GM**, ed. *The natural history of rabies*. 2 ed. Boston: CRC Press; 1991, p. 27-29.

KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico microbiológico – Texto e atlas colorido**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001.

KHAWPLOD, P. et al. **A novel rapid fluorescent focus inhibition test for rabies virus using a recombinant rabies virus visualizing a green fluorescent protein**. *J Virol Methods*, 125; 2005; p. 35– 40.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. New Jersey: 9 ed, Prentice Hall; 2000.

MARISSSEN WE, et al. **Novel Rabies Virus-Neutralizing Epitope Recognized by Human Monoclonal Antibody: Fine Mapping and Escape Mutant Analysis**. *J Virology* n.79(8), 2005; p.4672–4678.

MARCOVISTZ, R.; ROMIJN, P.C.; ZANETTI, C.R. IN: COURA JR, ed. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2005. Cap. 152. p. 1783-1794.

MATTOS, C.A. et al. **associate editors. Field's virology**. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; 2001. cap. 39. p.1245-78.

MATSUMOTO S. **Electron microscope studies of rabies virus in mouse brain**. *J Cell Biol*, 19,1963,p. 565-91.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **COMUNICAÇÃO** Brasília, Brasil; 2002c. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_raiva.pdf .Acesso em: 11 maio 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Nota Técnica. Raiva Humana Transmitida por Morcegos em Municípios do Estado do Pará.** Brasília: 2004; Ministério da Saúde.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE RAIVA HUMANA - **Distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada. Brasil, 1980 - 2005.** Brasília, Brasil; 2006a; Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/raiva_2006.pdf Acesso em: 15. maio. 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE TÓPICOS DE SAÚDE. RAIVA. **Situação da Doença no Brasil. Brasília, Brasil;** 2006b; Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21831 Acesso em: 05 março 2009

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, Brasília, Brasil; 2006c; Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=25213 Acessado em: 18 abril de 2009

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **WHO Expert committee on rabies: eighth report. Technical report series 824.** Geneva: WHO; 1992.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Expert Consultation on Rabies: first report. WHO Technical report series 931. Geneva: WHO; 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **WHO Guidelines for dog rabies control.** VPH 83-43. Geneva: WHO; 1983. Pagano M, Gauvreau K. **Princípios de bioestatística.** 2 ed. Brasil: Thompson; 2004.

PARREIRAS, H., FIGUEIREDO, P. **A epizootia de Biguaçu (nota preliminar).** Brasil Médico 1911. ano XXV (5), p. 71-74.

PRESCOTT ,L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. **Microbiology.** 3 ed. Boston: Wm. C. Brown Publishers; 1996.

REDWAN, E.R.M. et al. **Ovine anti – rabies antibody production and evaluation.** Comparative Immunology, Mycrobiology and Infectious Diseases v. 32. 2009. p.9-19

REICHMA, N. N.; M.L.A.B.; PINTO, H.B.F.; NUNES, V.F.P. **Vacinação contra a Raiva de cães e gatos.** São Paulo, Instituto Pasteur, 1999 (Manuais, 3) 32p.

RIZZO, L.F. **Imunoprofilaxis antirrabica humana com vacina de cerebro de raton lactente usando esquemas reducidos de vacunacion.** Rev Univ San Carlos 1983;Guatemala.

RUPPRECHT, C.E, HANLON C.A, HEMACHUDHA T. **Rabies re-examined.** Lancet Infect Dis 2, 2002. p. 327-343.

SOKOL.; F. et al. **Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA of rabies virus.** Virology, n. 38: 1969. p.651.

SOKOL, F.; STANCEK, D.; KOPROWSKI H. **Structural proteins of rabies virus.** J Virol, n. 7, 1971, p. 241.

SMITH, J.S.; YAGER P.A.; BAER G.M. **A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody.** Bull World Health Organ,n. 48: 1973, p. 535-541.

SMITH, J.S.; **Rabies serology.** In: Baer GM, ed. The natural history of rabies. 2 ed. Boston: CRC Press; 1991. cap. 12. p.235-254.

STEELE, J.H., FERNANDEZ PJ. **History of rabies and global aspects.** In: Baer GM, ed. The natural history of rabies. 2 ed. Boston: CRC Press; 1991. cap. 1. p.1-26.

SMITH JS, YAGER PA, BAER GM. **A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody.** IN: MESLIN, F-X, KAPLAN, MESLIN MM,KOPROWSKY, H, ed. Laboratory techniques in rabies. 4 ed. Geneva: World Health Organization, 1996. cap. 15. p. 181-192.

SMITH JS. **Rabies Virus.** in: MURRAY P,R, BARON EJ, JORGENSEN JH, PFALLER MA, YOLKEN RH, ed. Manual of Clinical Microbiology. 8 ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2003.cap. 102. p.1544-1552.

TOLLIS ,M. et al. **Immunization of monkeys with rabies ribonucleoprotein (RNP) confers protective immunity against rabies.** Vaccine n.9: 1991.p. 134-136.

TSIANG H, CECCALDI PE, LYCKE E. **Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons.** J Gen Virol, n. 72: 1991, p. 1191-1194.

TSIANG, H. **Rabies virus infection of myotubes and neurons as elements of the neuromuscular junction.** Rev Infect Dis, n.10, 1988; S733-S738.

TYLER, K.L.; NATHANSON, N. **Pathogenesis of viral infections.** In: Knipe DM. et al associate editors. Field's virology. Philadelphia: Lippincott Williams e Winlkins; 2001. cap. 9. p.199-244.

WIKTOR, T.J.; CLARK H.F. **Application of the plaque assay technique to the study of rabies virus-neutralizing antibody interactions,** Ann Microbiol. Inst Pasteur 1973; p.124A: 271.

WILDE, H. et al. **Rabies in Thailand:** 1990. Rev Infect Dis, n. 13:1991; p.644-652.

WHITE DO.; FENNER FJ. **Medical virology.** 4 ed. San Diego: Academic Press, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert committee on rabies.** Geneva. Eighth Report. Technical Report Series. 824. 1992. 88 p.

VENGATESAN D.et al. **Detection of rabies virus antigen or antibody using flow cytometry.** Wiley InterScience Journal:Disponível em: URL: <http://www3.interscience.wiley.com>. Acesso em: 04 maio de 2009.

VERNON, S.K, NEURATH, A.R, RUBIN, B.A. **Electron microscopic studies on the structure of rabies virus.** J Ultrastruct Res,n. 41,1972,p.29.

XAVIER, S.M, et al. **Raiva em morcego insetívoro Nyctinomops laticaudatus (E. Geoffroy, 1805) na Cidade do Rio de Janeiro, RJ – Brasil.** Revista da Universidade Rural do Rio de Janeiro, Série Ciências da Vida.Seropédica, RJ, EDUR 2005; 25 (suplemento): p.417-18

ZALAN E, WILSON C AND PUKITIS D. **A microtest for the quantitation of rabies vírus neutralizing antibodies.** J Biol Stand,n.7,1979,p. 213-220.

ZANNETTI, C.R. et al. **Failure of protection induced by a Brazillian vaccine against Brazillian wild rabies viruses.** Arch Virol,n.143,1998, p.1745–1756.

ZINKE, G. **Neue Ansichten der Hundswuth, ihrer Ursachen und Folgen nebst einer sichern Behandlungsart der von tollen Thieren gebissenen Menscher.** Gabler Jena Rev,n. 16,1804, p. 212.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.